

**PROBLEME BEI DER QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON
17 α -OH-PROGESTERON, DEHYDROEPIANDROSTERON,
ANDROSTENDION, TESTOSTERON UND
DIHYDROTESTOSTERON MIT DER
HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE**

MARINA BAUMEISTER

1985

*Des
München*



AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROFESSOR Dr. E. BUCHBORN

PROBLEME BEI DER QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON
17 α -OH-PROGESTERON, DEHYDROEPIANDROSTERON, ANDROSTENDION,
TESTOSTERON UND DIHYDROTESTOSTERON MIT DER
HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHIE *

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWURDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON
Marina Baumeister
aus Surheim

1985

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Mu 585/1-1)

MIT GENEHMIGUNG DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Berichterstatter: Prof.Dr.med.O.A.Müller

Mitberichterstatter: Prof.Dr.med.E.Buchborn

Dekan: Prof.Dr.med.W.Spann

Tag der
mündlichen Prüfung: 6. Mai 1986

Mein Dank gilt

Herrn Prof.Dr.med. O.A.Müller
für die Überlassung des Themas und die meiner Arbeit
gewährte Unterstützung,

Herrn Dr.med. G.K.Stalla
für die intensive Betreuung und Beratung während
der Versuche, sowie beim Verfassen der Arbeit,

Frau J.Stalla und Frl.S.Pleier
für ihre Assistenz und Beratung bei vielen Versuchen,
sowie für die Durchführung der RIA-Bestimmungen,

Frau F.Haag
für die photographische Gestaltung.

ABKÜRZUNGEN

ACTH	= Adrenocorticotropes Hormon
AGS	= Adrenogenitales Syndrom
$\Delta 4$	= Androstendion
Ag	= Antigen
AK	= Antikörper
cpm	= counts per minute = Impulse pro Minute
DHEA	= Dehydroepiandrosteron
DHEA-S	= Dehydroepiandrosteron - Sulfat
DHT	= Dihydrotestosteron
2.4.-DNPH	= 2.4.-Dinitrophenylhydrazin
DC	= Dünnschichtchromatographie
HCl	= Salzsäure
17 α -OH-P	= 17 α -Hydroxy-Progesteron
HPLC	= Hochdruckflüssigkeitschromatographie
I.D.	= Innendurchmesser
LH	= Luteotropes Hormon
μ l	= Mikroliter = $1 \cdot 10^{-6}$
ml	= Milliliter = $1 \cdot 10^{-3}$
n	= Anzahl der Proben
N	= Bodenzahl
ng	= Nanogramm = $g \cdot 10^{-9}$
nm	= Nanometer = $m \cdot 10^{-9}$
NNR	= Nebennierenrinde
PCO	= Syndrom der polycystischen Ovarien = Stein-Leventhal-Syndrom
pg	= Pikogramm = $g \cdot 10^{-12}$

PSI	= Druckeinheit nach dem internationalen Einheitensystem (Système International d'Unités); 1 PSI = 1 Pascal <Pa>
r	= Korrelationskoeffizient
RCM	= Radial komprimierendes Modul
RIA	= Radioimmunoassay
G	= Standardabweichung
T	= Testosteron
THF	= Tetrahydrofuran
UV	= Ultraviolett
VK	= Variationskoeffizient
Vit D ₂	= Ergocalciferol
Vit D ₃	= Cholecalciferol
$\bar{x}$	= Mittelwert

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. <u>ZIELSETZUNG</u>	1
2. <u>METHODEN UND ERGEBNISSE</u>	7
2.1. <u>Material und Geräte</u>	"
2.2. <u>Trennung der Hormonstandards</u>	10
2.2.1. <u>LH-20-Säulen</u>	"
2.2.1.1. <u> Methode</u>	"
2.2.1.2. <u> Ergebnisse</u>	13
2.2.2. <u>HPLC</u>	14
2.2.2.1. <u> Methode</u>	"
2.2.2.1.1. <u> Grundlagen</u>	"
2.2.2.1.2. <u> Säulen und Füllmaterialien</u>	21
2.2.2.1.3. <u> Detektoren</u>	23
2.2.2.1.4. <u> UV-Absorption</u>	25
2.2.2.1.5. <u> Laufmittel</u>	27
2.2.2.1.6. <u> Schema einer HPLC-Anlage</u>	29
2.2.2.2. <u> Ergebnisse</u>	31
2.2.2.2.1. <u> Laufmittelwirkung auf die Trennung</u>	"
2.2.2.2.2. <u> Wirkung unterschiedlicher Säulen</u>	35
2.2.2.2.3. <u> Absorptionsverhalten der Hormone</u>	37
2.2.2.2.4. <u> Elutionsprofile</u>	39
2.3. <u>Integration</u>	42
2.3.1. <u> Methode</u>	"
2.3.1.1. <u> Aufzeichnung und Ausdruck</u>	43
2.3.1.2. <u> Transformation des Detektorsignals</u>	44
2.3.1.3. <u> Peakerkennung und -registrierung</u>	45
2.3.1.3.1. <u> Optimierung der Peakbreite</u>	46
2.3.1.3.2. <u> Optimierung der Rauschunterdrückung</u>	47
2.3.1.3.3. <u> " " Flächenunterdrückung</u>	"

	<u>Seite</u>
2.3.1.4. Basislinienkorrektur	48
2.3.1.5. Quantitative Bestimmung	49
2.3.1.5.1. Berechnungsmodi	"
2.3.1.5.2. Berechnung nach dem Externen- Standard-Verfahren	51
2.3.2. <u>Ergebnisse</u>	53
2.3.2.1. Integrationsbeispiel	"
2.3.2.2. Nachweisgrenzen und Serum- konzentrationen	55
2.4. <u>Extraktion</u>	57
2.4.1. Quench-Effekt	"
2.4.2. <u>Flüssig-flüssig-Extraktion</u>	60
2.4.2.1. Optimierung des Extraktions- mittelvolumens	"
2.4.2.2. Verwendung verschiedener Extraktionsmittel	62
2.4.3. <u>Flüssig-fest-Extraktion auf Kieselgur</u>	63
2.4.3.1. Vorversuche	"
2.4.3.1.1. Probenverdünnung mit H ₂ O	"
2.4.3.1.2. Extraktion unverdünnter Proben	64
2.4.3.1.3. Bestimmung des pH-Optimums	"
2.4.3.1.4. Vergleich verschiedener Extraktionsmittel	65
2.4.3.1.5. Evaporation und Resuspension	"
2.4.3.2. Endgültige Methode	66
2.4.4. <u>Reversed-phase-Extraktion</u>	
C ₁₈ -Kartuschen	67
2.4.4.1. Vorversuche	68
2.4.4.1.1. Vorkonditionierung	"
2.4.4.1.2. Probenverdünnung	70
2.4.4.1.3. pH-Optimierung	71
2.4.4.1.4. Optimierung der Spülschritte	74
2.4.4.1.5. Extraktion der Hormonfraktion	76

	<u>Seite</u>
2.4.4.1.6. Extraktion unterschiedlicher Probenvolumina	79
2.4.4.1.7. Extraktion verschiedener Hormone	81
2.4.4.2. Endgültige Methode	82
2.4.5. _ _ _ <u>Kombination der Extraktionsverfahren</u>	84
2.4.5.1. Ausschütteln in organischen Lösungsmitteln in Kombination mit dem Sep pak ^R -Verfahren	85
2.4.5.2. Flüssig-fest Extraktion auf Kieselgur in Kombination mit dem Sep pak ^R - reversed-phase-Verfahren	86
2.4.5.3. _ _ <u>Endgültige Methode</u>	89
2.4.5.4. _ _ <u>Ergebnisse</u>	90
2.4.6. HPLC der Serumextrakte	91
2.4.6.1. _ _ <u>Ergebnisse</u>	92
2.5. <u>Kombination von HPLC und RIA</u>	95
2.5.1. Prinzip des RIA	"
2.5.2. _ _ _ <u>Ergebnisse</u>	97
2.6. <u>Derivatisierung der Hormone</u>	101
2.6.1. _ _ _ <u>Methode</u>	"
2.6.2. Dünnschichtchromatographie der Derivate	105
2.6.3. Präparative Dünnschicht- chromatographie	108
2.6.4. _ _ _ <u>Ergebnisse</u>	110
<u>3. DISKUSSION</u>	112
3.1. Trennverfahren	"
3.2. Integration	115
3.3. Extraktion	118
3.4. HPLC und RIA	121
3.5. Derivatisierung	122

		<u>Seite</u>
<u>4.</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	125
<u>5.</u>	<u>LITERATUR</u>	130

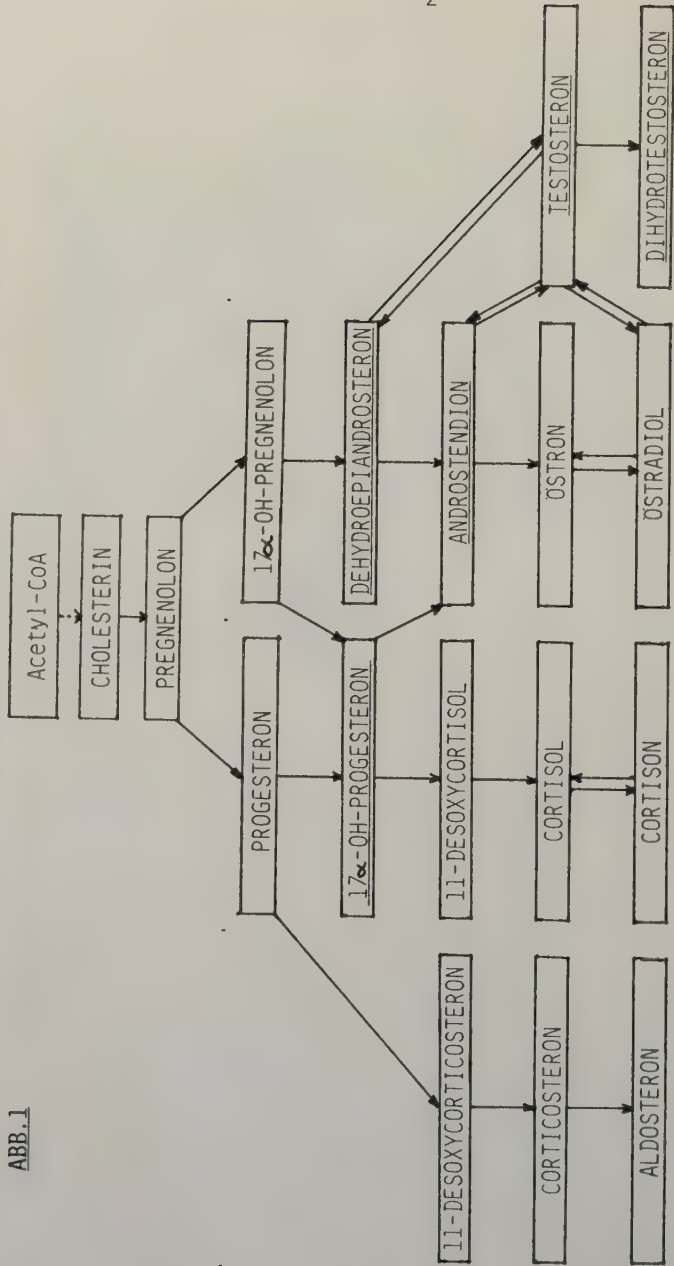
1. Zielsetzung:

Für bestimmte, mit z.T. veränderten Serumandrogenspiegeln einhergehende Krankheitsbilder ist zur Klärung der Genese und der zu ziehenden therapeutischen Konsequenzen das Wissen darum, welche Steroide quantitativ verändert sind und wenn ja, in welchem Ausmaß, von großer Bedeutung. Eine wesentliche Rolle kommt dabei besonders den fünf Steroidhormonen 17α -OH-Progesteron (17α -OH-P), Dehydroepiandrosteron (DHEA), Androstendion (Δ^4), Testosteron (T) und Dihydrotestosteron (DHT) zu, und zwar aufgrund ihrer unterschiedlichen Entstehungsweise. Abb.1 veranschaulicht schematisch ihre Produktion im Rahmen der adrenalen Steroidbiosynthese:



VERKÜRZTES SCHEMA DER ADRENALEN BIOSYNTHESE DER STEROIDHORMONE

ABB. 1



17 α -OH-Progesteron, selbst ein Gestagen, ist einer der Ausgangsstoffe der adrenalen Androgenproduktion. Dehydroepiandrosteron und Androstendion sind schwache Androgene. Während Dehydroepiandrosteron nahezu ausschließlich in der NNR gebildet wird, entsteht Androstendion im weiblichen Organismus je zur Hälfte in Ovarien und NNR.

Testosteron, beim Mann fast ausschließlich vom Hoden sezerniert, entsteht bei der Frau zu 70% durch periphere Konversion aus Androstendion, zu 10% aus DHEA, die restlichen 20% werden von der NNR produziert.

Dihydrotestosteron, beim Mann durch periphere Reduktion aus Testosteron gebildet, entsteht bei der Frau so gut wie vollständig durch Konversion aus Androstendion.

Die Kenntnis veränderter Hormonspiegel der genannten fünf Steroidhormone ist von Relevanz in der Diagnostik folgender Erkrankungen:

A) Adrenal bedingte Störungen (75)

1. Androgene produzierende NNR-Adenome oder -Carcinome (klin. Bild des Hirsutismus oder der Virilisierung bei der Frau)

Die DHEA- und DHEA-S-Spiegel sind erhöht, sowie die Spiegel der abhängigen Hormone $\Delta 4$, T u. DHT. (Abb.1)

2. Ein Cushing-Syndrom bei beidseitiger NNR-Hyperplasie aufgrund einer vermehrten Produktion ATCH. (hypothalamische-, hypophysäre- oder paraneoplastische Genese)

Erhöht sind DHEA, sein Sulfat, $\Delta 4$, T, DHT.

3. Das kongenitale adrenogenitale Syndrom (AGS).
Häufigste Ursache ist der 21α -Hydroxylase-Defekt.
Es kommt hierbei zu einem Block bei der Bildung
von 11 -Desoxycortisol aus 17α -OH-P. (Abb.1)
In der Folge sind der 17α -OH-P-Spiegel, sowie
die Spiegel von DHEA und der übrigen abhängigen
Hormone erhöht.

B) Störungen ovarieller Genese.

1. Androgenproduzierende Ovarialtumore: (15)
Sie sind insgesamt sehr selten. Arrhenoblastome
(weniger als 1% aller Ovarialtumore) sind am
häufigsten. Erhöht sind die Spiegel von $\Delta 4$
und T.

2. Das Syndrom der polyzystischen Ovarien
(PCO-Syndrom) = Stein-Leventhal-Syndrom
Klinisch imponieren Amenorrhoe oder Oligo-
menorrhoe bei anovulatorischen Zyklen, Hirsutis-
mus und häufig Adipositas.
Erhöht sind die Gonadotropine, vor allem das
luteotrope Hormon (LH), sowie $\Delta 4$ und T.

Die heute übliche Methode der Androgenbestimmung
ist die Messung im RIA. Eine routinemäßige Labor-
diagnostik existiert in unserem Labor für die Bestim-
mung von T, seit kurzem für DHEA-S.

Folgende Probleme, die zur Suche nach einer methodi-
schen Alternative mit dieser Arbeit geführt haben,
ergeben sich dabei:

- Die verwendeten, mühevoll zu gewinnenden, anti-
steroidalen Antikörper zeigen eine z.T. sehr hohe

Kreuzreaktivität gegenüber anderen Steroiden ähnlicher chemischer Struktur. Besonders stark reagieren z.B. die Antikörper gegen T mit DHT kreuz.

- Um die Kreuzreaktivität auszuschalten wird schon lange an Versuchen zur Trennung der Hormone vor Einsatz im RIA gearbeitet. (68,57,58) Vielfach bedient man sich dabei der Säulenchromatographie mit Sephadex^R-Säulen. Seit Ende der 70er Jahre erfährt die Technik der HPLC für die Steroidtrennung zunehmend Verwendung. (48,19,13,31,64)
- Am Beginn dieser Arbeit steht der Vergleich beider Trennmethode, der Sephadex-Säulen und der HPLC, in Hinblick auf die Praktikabilität für unsere Ziele.
- Die im RIA eingesetzten radioaktiven Steroide sind mit Tritium (³H) markiert. Dieses hat eine Halbwertszeit von 12 Jahren, was zu Schwierigkeiten bei der Abfallbeseitigung führt, auch dies ein Grund, eine Alternative zu den radioimmunologischen Bestimmungsmethoden zu suchen.
- Um störende Verunreinigungen der Seren zu beseitigen, suchen wir nach einer Extraktionsmethode mit hoher Wiederfindung bei großer Effektivität. Hierzu werden vergleichsweise das Ausschütteln mit Äther, die Extraktion unter Verwendung von Kieselgur (Extrelut^R), sowie die Extraktion mit C₁₈-reversed-phase-Kartuschen (Sep pak^R) und die Kombination der einzelnen Verfahren ausgetestet.

In der Steroidhormonforschung haben diese Methoden bereits mehrfach Anwendung erfahren. (2,65,54,53, 74,55)

Benutzt man, wie in unserem Fall, die HPLC als Trennverfahren, so zeichnen die Elutionsprofile der Trennungen Hormonpeaks auf, deren Flächen sich proportional zur Hormonkonzentration der aufgetragenen Proben verhalten.

Diese Feststellung brachte 1981 Mayer und Schmidt-Gayk auf die Idee, die Konzentration von Vitamin D₂ und D₃ mit Hilfe der Integration ihrer Peakflächen zu bestimmen. (42)

Versuche mit Schilddrüsenhormonen (7) und Steroidhormonen folgten. Hier zeigte sich jedoch, daß deren Serumkonzentrationen für die UV-Detektion mit herkömmlichen Detektoren in der Regel zu niedrig sind.

Die chemische Kopplung von stärker absorbierenden Farbstoffen an die zu messenden Substanzen wurde in den letzten Jahren vielfach erprobt, um die Nachweisgrenze bei der Detektion herabzusetzen. (7,27,66-68, 20)

Auch diese Arbeit bedient sich der Derivatisierung beim Versuch der integrativen Bestimmung der Serumspiegel von 17 α -OH-P, DHEA, Δ 4, T und DHT im Anschluß an eine hochdruckflüssigkeitschromatographische Trennung.

2. METHODEN

2.1. Materialien und Geräte

Organische Lösungsmittel für die HPLC

Promochem, Wesel o.

Merck, Darmstadt

Sie waren alle vom Reinheitsgrad "für die Chromatographie" (Lichrosolv^R, Merck bzw. Chrom AP, Promochem)

Sonstige Lösungsmittel waren "pro analysi" von

Merck, Darmstadt

Wasser bereiteten wir mit Norganic^R-Patronen selbst auf.

Millipore, Neu-Isenburg

- Filtrationssystem aus Glas für die Wasseraufbereitung

Millipore, Neu-Isenburg

- Filter: 0,45 µm MF-Membranen

0,45 µm Membranfilter aus Polytetrafluoräthylen
(für organ. Lösungsmittel)

Millipore

Millex-HV, 0,45 µm-Filter

Waters, Koenigstein

- HORMONSTANDARDS:

Testosteron

17~~α~~-OH-P

Δ⁴

DHEA

DHT

Cortisol

Fluka-Feinchemikalien,

Neu-Ulm

- RADIOAKTIV MARKIERTE HORMONE

Testosteron, <1,2,6,7-³H>

DHEA, <1,2-³H(N)>

DHT, <1,2-³H>

17~~α~~-OH-P, <1,2-³H(N)>

Δ⁴, <1,2,6,7-³H(N)>

Cortisol, <1,2,6,7-³H(N)>

New England Nuclear, Dreieich,

BRD

HPLC - Zubehör:

6000 A Doppelkolbenpumpe

Waters, Koenigstein

M 440 Absorbance Detector, (254nm u. 280nm)

M 730 Data Module, Integrator

Extended Wavelength Module, (214nm u. 229nm)

RCM - 100, Kompressionskammer

Waters, Koenigstein

FRACTION COLLECTOR; FRAC-100

Pharmacia, Freiburg

C₁₈-Säule: Radial-PakTM, RP-18, 5mm I.D., 10 -Material

C₈-Säule: Radial-PakTM, RP-8, 5mm I.D., 10 -Material

μ - Bondapak, C₁₈-Säule, 3,9mm x 30cm

Nova-Säule (in Erprobung)

Waters, Koenigstein

Guard-Column, Vorsäule

Guard-PakTM, Vorsäule

Column Temperature Controller, Wärmeofen, No 07011

Sämtliches Zubehör, Ersatzteile und Werkzeuge f.d. HPLC

Waters, Koenigstein

SEP PAK -C₁₈-Kartuschen

Waters, Koenigstein

Extrelut^R 1, Extrelut^R 3 u. Extrelut^R- Nachfüllpackungen

Merck, Darmstadt

Auslauf-Kanülen 0,6/26 mit Luer-Ansatz

Merck, Darmstadt

Sephadex -LH-20-Gel

Pharmacia, Freiburg

Szintillationsmittel, Unisolve I,

Zinsser Analytic,

Frankfurt/Main

20μl, 100μl, 500μl Injektionsspritzen f.d. HPLC

10ml Luer Lock-Spritzen

Low UV Pic Reagent A

Waters, Koenigstein

Dünnschichtchromatographie-Kammer aus Glas
Desaga, Heidelberg

Kieselgel-Dünnschichtfolien
Aluminiumoxid/Plastikbeschichtet, 60F, 254, 0,2mm
Merck, Darmstadt

UV-Strahler, MIN UVIS, 254nm u. 366nm
Desaga, Heidelberg

2,4-Dinitrophenylhydrazin
n-Butylamin
Merck, Darmstadt

Rotationsverdampfer
Büchl, Schweiz

Vortex-Schüttler
Bender & Hobein, München

Vortex-Evaporator
Buchler-Amersham, Braunschweig

Thermostat, IKA-Combimag
Janke & Kunkel IKA-Werk,
Staufen

Exsikkator, Dry-Seal und sämtliche sonstigen Glas-
geräte, Trichter, Filter, Gefäße
Wheaton, Millville, USA

β- Counter, BF 5001A
BF-GmbH, München

Lyophilisator, Unitrap II
Virtis, USA

DC-Scanner II, LB 2723
Berthold, BRD

Glassäulen für die LH-20-Chromatographie, 20cm x 2,5mm
Bender & Hobein, München

2.2. TRENNUNG DER HORMONSTANDARDS

2.2.1. Säulenchromatographie mit Sephadex^R LH-20

2.2.1.1. Methode

Sephadex LH-20-Gel besteht aus vernetzten Dextranketten, die an Ätherbrücken Hydroxypropylgruppen tragen. Dadurch erhält das Gel sowohl hydrophile, als auch lipophile Eigenschaften. (50) Der Teilchendurchmesser beträgt 25 μ m - 100 μ m. Das Gel wird hauptsächlich verwendet zur Trennung biologisch aktiver Substanzen mit organischen Laufmitteln.

Bei Verwendung von Laufmittelgemischen, wie in unserem Fall, beruht die Trennung in der Hauptsache auf dem Prinzip der Verteilungschromatographie; d.h. das Gel als inerter Träger nimmt die polare Laufmittelkomponente auf und bildet die stationäre Phase. Die mobile Phase ist unpolar. Polare Substanzen verbleiben länger in der stationären Phase und werden somit stärker retiniert als unpolare Substanzen. Weitere Trennmechanismen, die am Rande wirksam werden, sind die Gelfiltration (d.h. die Trennung nach der Molekülgröße), Adsorptionseffekte (z.B. durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken) und Unterschiede im Verhalten von Kationen und Anionen. (Siehe 2.3.2.1.) Unpolare Laufmittel alleine zu verwenden ist unzumutbar. Der pH-Wert der Laufmittel soll größer 2 sein, es sollen keine stark oxidierenden Reagenzien enthalten sein.

Wir verwenden Glassäulen von 1cm Durchmesser und 15cm Länge. Sephadex LH-20-Gel quillt über Nacht bei +4°C im Laufmittelgemisch und wird anschließend entgast. Beim Gießen der Säulen ist auf einen konti-

nuierlichen, gleichmäßigen Gelfluß ohne Bildung von Luftblasen zu achten. Ein Überstand aus Laufmittel muß das Trockenlaufen der Säule verhindern. Durch sorgfältiges Spülen nach jedem Lauf regeneriert, ist eine Säule über ca. 9-15 Monate verwendbar. (57)

Wir benutzen alternativ zwei Laufmittelgemische für die Trennung von Δ^4 , T, DHT und DHEA:

1. Cyclohexan:Chloroform:Methanol = 8:1:1 (n.Bidlingmaier)
2. n-Heptan:Chloroform:Methanol = 85:5:5 (n.Bassett)

17 α -OH-P müsste, was von uns nicht erprobt wird, in einem Extraschritt mit Isooctan:Methanol:Toluol = 12,4:3,6:4 (n.Bidlingmaier) chromatographiert werden.

Die Trennung von tritierten Hormonstandards wird wie folgt durchgeführt:

Je 100 Mikroliter der radioaktiven Hormonlösungen ($\hat{=}$ ca. 10 000cpm) werden auf die Säule aufgetragen und unter kontinuierlichem Laufmittelstrom eluiert. Mit dem Fraktionssammler werden Fraktionen à 500 μ l gesammelt. Ein Aliquot jeder Fraktion wird unter Zugabe von Szintillationsmittel im β -Counter gezählt. Die Radioaktivität enthaltenden Fraktionen entsprechen den Hormonpeaks. (Abb. 2)

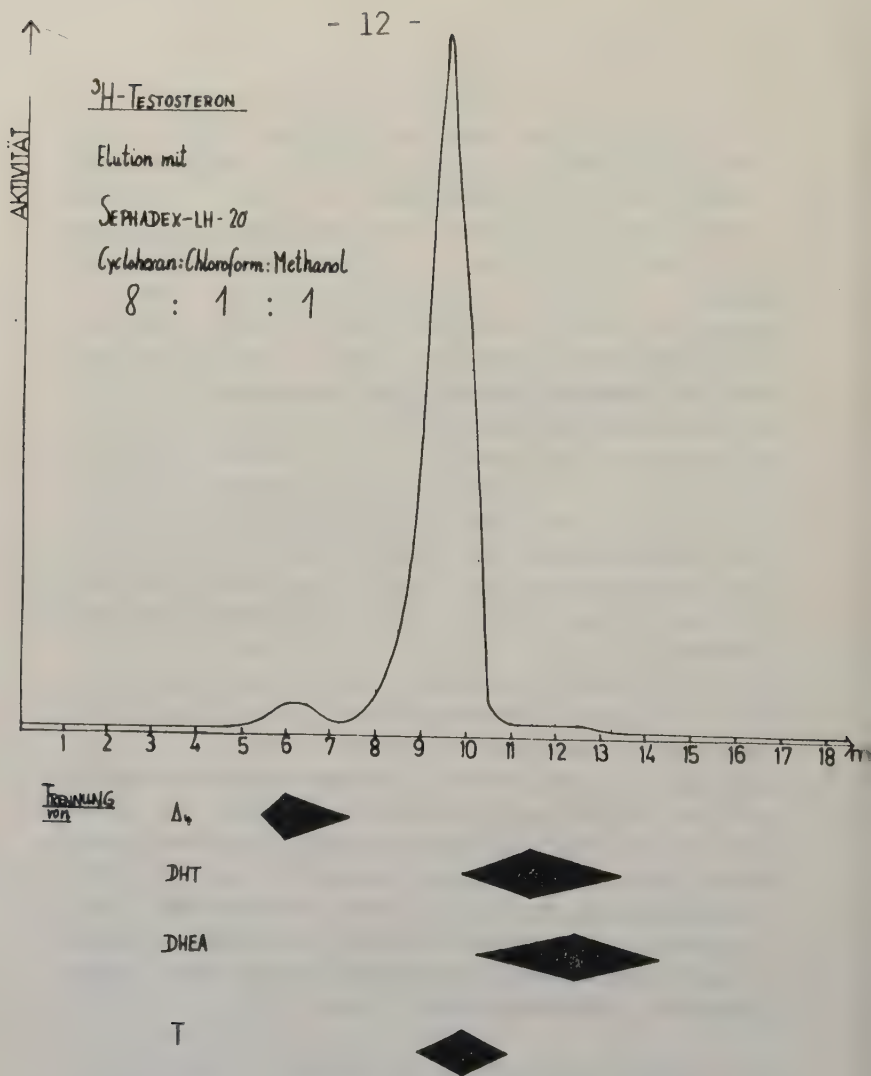


ABB.2 SÄULENCHROMATOGRAPHIE VON
 ^3H -TESTOSTERON

2.2.1.2. Ergebnisse

Mit Cyclohexan:Chloroform:Methanol = 8:1:1 als Laufmittel eluieren:

Androstendion	bei ml 5,0 - 7,5	
Testosteron	bei ml 9,0 - 10,5	(Abb.2)
DHT	bei ml 10,0 - 13,5	
DHEA	bei ml 11,0 - 14,5	

Die Trennung mit n-Heptan:Chloroform:Methanol = 85:5:5 läßt

DHT	bei ml 8,0 - 11,0	
Androstendion	bei ml 12,0 - 12,5	
DHEA	bei ml 14,0 - 16,0	
Testosteron	bei ml 16,5 - 18,5	eluieren.

Bei Verwendung jeweils eines einzigen Laufmittelsystems bleibt die Trennung aufgrund der dichten Peakfolge bzw. der Peaküberschneidungen unbefriedigend.

Die Reproduzierbarkeit der peakenthaltenden Fraktionen hingegen ist gut, soweit man bei kleiner Stichprobe von 3 bzw. 4 Trennläufen pro Hormon und Laufmittel eine Aussage machen kann. Die Verschiebungen der Peaks liegen bei $\pm 500\mu\text{l}$.

Die Flußrate der Säulen ohne Pumpen ist sehr gering. Für die Elution von 30 Fraktionen à 500ul werden ca. 6 Stunden benötigt.

Ca. 30% der frisch gegossenen Säulen sind nicht verwendbar. Nur bei ca. der Hälfte der verbleibenden Säulen ist die Wiederfindung mit über 60% ausreichend.

2.2.2. HPLC

2.2.2.1 Methoden

2.2.2.1.1. Grundlagen

Die Methode der Hochdruckflüssigkeitschromatographie entwickelt sich seit Beginn der 70er Jahre, für die Steroidtrennung wird sie seit Ende der 70er Jahre eingesetzt. Sie stellt eine Wiederbelebung der Säulenchromatographie dar, die lange Zeit durch andere chromatographische Verfahren, wie die Dünnschicht- und Gaschromatographie verdrängt worden war. (60,11)

Der Hauptunterschied der HPLC im Vergleich zu anderen flüssigkeitschromatographischen Methoden liegt in der Verwendung ultrafeinen Packmaterials. Dies ist möglich, da resultierende lange Elutionszeiten heute pumpengesteuert durch hohen Durchflußdruck stark herabgesetzt werden können. Die Technik entwickelte Detektoren zur schnellen Analyse der durchfließenden Probe.

Es lassen sich mit der HPLC praktisch alle in der Flüssigkeitschromatographie möglichen Trennprinzipien anwenden.

Jegliche chromatographische Trennung beruht auf den unterschiedlichen Durchwanderungsgeschwindigkeiten der zu trennenden Substanzen. In der Chromatographie hat jede Substanz prinzipiell zwei Aufenthaltsmöglichkeiten: die stationäre Phase und die mobile Phase des Systems. Die Durchwanderungsgeschwindigkeit und daraus folgend die Elutionszeit t jeder Substanz ist abhängig von den Wechselwirkungen, die sie mit der stationären Phase eingeht. Vorgegeben ist die Durchflußgeschwindigkeit der mobilen, die Probe

transportierenden Phase. Sie ist bei der HPLC stets eine Flüssigkeit, das Elutionsmittel.

Abhängig von der Chemie der zu trennenden Komponenten, ihrer Molekülgröße, ihrer Polarität, dem hydrophilen oder lipophilen Charakter und ihrer Löslichkeit in Wasser oder organischen Laufmitteln, kommen unterschiedliche chromatographische Verfahren zur Anwendung (40).

Es sind dies im Wesentlichen:

- Die Adsorptionschromatographie (stationäre Phase = Festkörper) mit fließendem Übergang zur Verteilungschromatographie (stationäre Phase = Flüssigkeit), wobei die stationäre Phase polar, das Laufmittel unpolar ist (herkömmliche, sog. "normal-phase"-Chromatographie). Polare Substanzen gehen hier starke Wechselwirkungen mit der stationären Phase ein, werden stärker retiniert, eluieren später als unpolare.
- Für die HPLC der Steroide verwenden wir ausschließlich die "reversed-phase"-Chromatographie. Es handelt sich um eine Abwandlung der Adsorptionschromatographie, wobei die stationäre Phase aus einem unpolaren Festkörper besteht und die mobile Phase polar ist. Meist hält ein inerte hydrophober Träger ein unpolares, organisches Lösungsmittel stationär, während mit polarem, Wasser enthaltendem Laufmittel eluiert wird. Dies entspricht dem Prinzip der Verteilungschromatographie.
In beiden Fällen eluieren polare Substanzen vor unpolaren. (Über Vorteile von Adsorptions- bzw. reversed-phase-Chromatographie in der Steroidanalytik siehe J.-T.Lin und E.Heftmann (39)).

- Andere Verfahren, wie die Affinitätschromatographie, die Gelfiltration und die Ionenaustauschchromatographie finden in dieser Arbeit keine Anwendung und sollen daher nur am Rande erwähnt werden.
- Bemerkenswert ist noch die sogenannte Ionenpaar-chromatographie, die es ermöglicht durch Zugabe großer, abschirmender Genionen (z.B. in Form von n-Butylamin) ionogene Substanzen auch mit Verfahren zu trennen, die normalerweise nur nicht-ionogene zur Trennung bringen (wie z.B. die reversed-phase-Chromatographie).

In der HPLC gilt es generell, einen Kompromiß in der Erfüllung folgender drei Hauptforderungen zu finden:

- hohe Auflösung,
- große Belastbarkeit,
- schnelle Analyse.

Die Auflösung ist wie folgt definiert: (10,11,46)

$$\begin{aligned}\text{Auflösung } R &= \frac{\text{Abstand zweier Peakspitzen}}{\text{arithmetisches Mittel der Basisbreiten}} = \\ &= \frac{t_2 - t_1}{1/2(W_1 + W_2)}\end{aligned}$$

$R = 1$ bedeutet die gerade vollständige Trennung beider Komponenten.

Der Abstand zweier Peaks ist ein Maß für die Selektivität der Säule.

Die Säuleneffektivität findet ihren Ausdruck in der Basisbreite W .

Die Auflösung ist abhängig von:

- dem Kapazitätsfaktor k
- dem Selektivitätsfaktor α
- der Leistungsfähigkeit der Säule, gemessen an der Zahl N der theoretischen Böden.

Ein theoretischer Boden ist eine fiktive Ebene innerhalb einer Säule, bei der die Gleichgewichtseinstellung zwischen stationärer und mobiler Phase abgeschlossen ist. Je mehr "Gleichgewichtszustände" eintreten, desto besser ist die Trennleistung der Säule.

Definitionsgemäß gilt:

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

t_0 = Totzeit = Aufenthaltszeit in der mobilen Phase, für alle Substanzen gleich.

$$a = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0}$$

$$N = 25 \cdot \left(\frac{t_r}{W_{5\sigma}} \right)^2$$

$W_{5\sigma}$ = Peakbreite bei 4,4% der Höhe

oder:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{W_b} \right)^2$$

W_b = Peakbreite, die sich aus den Schnittpunkten der Basislinie mit den Wendetangenten ergibt.

Der Zusammenhang mit der Auflösung lautet wie folgt:

$$R = \frac{1}{4} \cdot \frac{a-1}{a} \cdot N \cdot \frac{k}{k+1}$$

Eine Erhöhung der Auflösung läßt sich also über die Änderung von Kapazität, Selektivität oder Bodenzahl erzielen.

Es gilt hierzu möglichst optimale Gele und Elutionsmittel zu finden und Totvolumina zu vermeiden.

Auch kann Temperaturerhöhung die Anzahl der theoretischen Böden steigern und die Trenndauer verkürzen. Die durch Temperaturerhöhung verminderte Laufmittelsviskosität führt zur schnelleren Gleichgewichtseinstellung zwischen stationärer und mobiler Phase, die Flußrate kann gesteigert werden.

Bei der HPLC ist weiter auf Druckkonstanz zu achten. Der Gesamtdruck setzt sich zusammen aus dem von der Pumpe erzeugten Druck und dem Rückdruck des Säulensystems. Der Druck sollte im Bereich von 70 - 1500 PSI liegen und darf maximal 2000 PSI nicht überschreiten. Das Füllmaterial wird sonst zu stark komprimiert, die Säulenpackung wird inhomogen, die Peakbanden verbreitern sich.

Den Einfluß der Durchflußgeschwindigkeit auf die Trennleistung beschreibt die van Deemter - Gleichung:

$$\frac{L}{N} = A + \frac{B}{V} + C \cdot V$$

L = Säulenlänge (mm)

N = Bodenzahl

A, B, C = Konstante

V = Durchflußgeschwindigkeit (cm³/h)

- Die Konstante A ist von der Flußgeschwindigkeit unabhängig. Hier geht die "Eddy-Diffusion" ein, die determiniert wird von der Gelpartikelgröße, dem Porenanteil, von unterschiedlichen Wegstrecken innerhalb der Poren und Kanäle. Inhomogene Säulenpackung führt zur Erhöhung von A , zum Abweichen von der laminaren Strömung und zur Verschlechterung der Auflösung.
- Das zweite Glied der Gleichung $\frac{B}{V}$ ist v.a. bei niedriger Durchflußgeschwindigkeit zu beachten, wenn Strömungsanomalien der mobilen Phase die Trennleistung verschlechtern.
- Der C -Term wird dominierend bei hoher Durchflußgeschwindigkeit. $C \cdot V$ berücksichtigt unvollständige Gleichgewichtseinstellung, die u.a. von der Gelpartikelgröße abhängt.

Kurz: Für jede Trennung muß es eine für die Auflösung optimale Geschwindigkeit geben, die es zu finden gilt.

Bei der HPLC wird die Probe diskontinuierlich in den kontinuierlich strömenden Eluenten aufgetragen. Auf eine Zone der reinen Substanz folgt im Idealfall eine Zone des reinen Eluenten.

Es handelt sich um eine Elutionsanalyse. Die Wechselwirkung zwischen Eluent und stationärer Phase im Vergleich zur Wechselwirkung zwischen Probe und stationärer Phase ist dabei gering. Bleibt sie konstant, handelt es sich um ein isokrates System.

Läßt man die Wechselwirkung des Eluenten mit der stationären Phase im Analysenverlauf zunehmen, d.h. erhöht man seine Elutionskraft kontinuierlich oder stufenweise, so erzeugt man einen Gradienten.

Von der Gradientenelution haben wir Abstand genommen. Sie findet v.a. dann Anwendung, wenn ein Substanzgemisch aus Komponenten sehr unterschiedlicher Polarität in passabler Analysenzeit getrennt werden soll.

Für unsere Zwecke ist das isokrate System ausreichend. Wir vermeiden den ungleich größeren technischen und apparativen Aufwand (z.B. den Einsatz einer zweiten Pumpe), sowie spezifische Nachteile, wie z.B. das Driften der Basislinie.

2.2.2.1.2. Säulen und Füllmaterialien

Vier verschiedene Säulen, bereits gepackt erworben, werden von uns benutzt. Ihre Füllmaterialien bestehen in unterschiedlichen Modifikationen alle aus mit Kieselgel (=Silicagel) beschichteten, meist sphärischen Glaspartikeln. Dies sind vollkommen poröse Materialien, die gleichzeitig druckstabil sein müssen.

Sie unterscheiden sich im wesentlichen durch unterschiedliche Länge der Kieselgelseitenketten (18 bzw. 8 C-Atome = Octadecyl- bzw. Octylsilan). Die Teilchendurchmesser betragen entweder 5 Mikrometer oder 10 Mikrometer. Die Seitenketten tragen keine funktionellen Gruppen und erhalten somit den für die stationäre Phase der reversed-phase-Chromatographie notwendigen unpolaren Charakter.

Der Innendurchmesser von HPLC-Säulen ist stets sehr klein. Er ist bei unseren Säulen 4 bzw. 5 mm dick.

Säulendaten:

C₁₈- Säule, 5mm I.D. · 15cm, 10µm große sphär. Teilchen

C₈ - Säule, 5mm I.D. · 15cm, 10µm große sphär. Teilchen

Nova-Säule, 5mm I.D. · 15cm, 5µm große sphär. Teilchen

µ-Bondapak C₁₈, 4mm I.D. · 30cm, 5µm große asphär. Teil.

- Nur eine der Säulen, die µ-Bondapak-Säule, ist eine herkömmliche Stahlmantelsäule.

Bei ihr konnten wir durch Verwendung eines Säulenwärmefens bei 53°C versuchen, die Auflösung und v.a. die Retentionszeit zu verbessern.

- Die übrigen drei Säulen sind Kartuschen mit flexibler Wand aus Polyethylen. Sie unterliegen in einer Druckkammer der radialen Kompression durch eine hydraulische Flüssigkeit (RCM-System). Der Erfolg ist eine bessere Homogenität der Säulenpackung und die Verringerung störender Wandeffekte. Dies führt zu höherer Trennleistung und schnellerer Analyse durch Erhöhung der Bodenzahl.

Das Modul für radiale Kompression ist nur für sphärische Füllmaterialien zu verwenden; asphärische Partikel lassen sich im sog. "Z-Modul" komprimieren.

Die von uns bestimmten Bodenzahlen sind für die vier Säulen in etwa gleich und liegen bei Neuwert zwischen 4500 und 5500 Böden.

Die Bestimmung geschieht wie folgt:

Von einem Gemisch aus 2 Tropfen Benzol auf 4ml Methanol werden 10 μ l als Probe injiziert. Laufmittel ist reines Methanol. Die Flußgeschwindigkeit liegt bei 1ml/min, die Schreibergeschwindigkeit bei 1cm/min. Die Detektionsempfindlichkeit entspricht mittlerer Empfindlichkeit.

Der erzielte Peak wird ausgemessen und die entsprechende Bodenzahl N anhand der bekannten Formeln berechnet (Siehe S.17).

2.2.2.1.3. Detektoren und Wellenlängen

Nach verschiedensten Prinzipien arbeitende Detektoren sind auf dem Markt. Für die Verwendung eines jeden Detektors müssen bestimmte Voraussetzungen gegeben sein, die seinen Einsatz limitieren.

Ihnen allen gemeinsam ist, daß das von ihnen erzeugte Signal der jeweiligen Probenkonzentration proportional ist.

In der Steroidanalytik eingesetzt werden UV- und Fluoreszenzdetektoren:

- Der UV-Detektor setzt UV-Absorption voraus. Lösungsmittel, die bei entsprechenden Wellenlängen absorbieren, können nicht verwendet werden.

Er ist der am häufigsten gebrauchte Detektor. Auch wir verwenden ihn für die Detektion der Steroide. Sein Limit liegt, wie das aller Detektoren, in der oft ungenügenden Nachweisempfindlichkeit bei guter Selektivität und geringer Anfälligkeit gegenüber Temperatur- und Druckschwankungen.

- Für die Messung mit dem Fluoreszenzdetektor sind nur Substanzen geeignet, die sich durch Bestrahlung im nahen UV-Bereich zur Fluoreszenz anregen lassen und ihre Strahlung im sichtbaren Bereich aussenden. Auch lassen sich viele Lösungsmittel nicht verwenden. Mehrfach wurde versucht, durch Derivatisierung von Steroiden mit Fluoreszenzfarbstoffen und Einsatz des Fluoreszenzdetektors den Nachweis zu verbessern (48,28,70). Die Derivatisierung mit Isonicotinylhydrazin (INH) erbringt gegenüber der UV-Detektion keinen sensitiveren Nachweis (20). T.Kawasaki, M.Maeda und A.Tsuji beschreiben 1981 durch Verwendung von Dansylhydrazin bei hohem Aufwand der Methode eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit für

DHEA-Sulfat bis auf maximal 60pg (27). Demgegenüber stellen Toothaker, Sundaresan e.a. für den Nachweis von Hydrocortison keinen Unterschied bei Verwendung von UV-Detektion und Fluoreszenzdetektion nach Dansylierung fest. Sie geben der weniger aufwendigen UV-Detektion den Vorzug (70).

Aufgrund spezifischer Probleme kommen Refraktometer, Adsorptions-, Transport-, Flammenionisations-, Radioaktivitäts- und elektronische Detektoren in der Steroidanalytik bislang nicht zum Einsatz.

Sehr empfindlich im Nachweis sind die Elektronenverschiebungen registrierenden, noch in der Entwicklung befindlichen, elektrochemischen Detektoren, deren Anwendung jedoch auf leicht oxidierbare Substanzen beschränkt ist. In der Analytik der Katecholamine wurden damit beachtenswerte Erfolge erzielt. Inwieweit der Einsatz erfolgversprechend ausgedehnt werden kann, wird die Zukunft zeigen.

2.2.2.1.4. UV-Absorption

Zur Messung mit UV-Detektoren ist die Kenntnis des Absorptionsverhaltens der betreffenden Substanzen unumgänglich.

Allgemein versteht man unter dem UV-Spektrum einer Substanz ihre Lichtabsorption im Bereich von 210nm-400nm Wellenlänge. Absorption von Lichtquanten überführt die Substanz in einen angeregten, energiereicheren Zustand. Es kommt zur Resonanz von Elektronenpaaren und π - Elektronen mit dem UV-Licht. (45) Die Absorptionsintensität wird ausgedrückt durch die Extinktion oder den Extinktionskoeffizienten, die das Lambert-Beer'sche-Gesetz zueinander in Bezug setzt:

$$E = \log \frac{I_0}{I} = e \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion

I_0 = eingestrahelte Lichtintensität

I = austretende Lichtintensität

c = Konzentration (Mol/l)

d = Schichtdicke (cm)

e = dekadischer molarer Extinktionskoeffizient (l/cm·Mol)

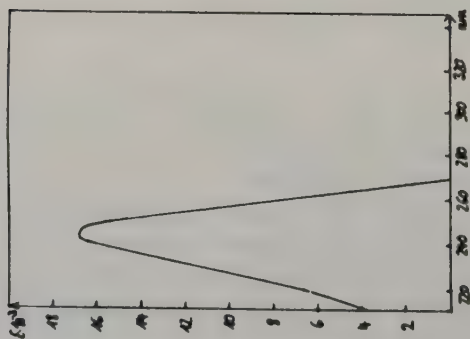
Mit unserem Festwellen-Detektor läßt sich bei den Wellenlängen 254nm und 280nm, über eine zusätzliche Zinklampe bei 214nm und über eine zusätzliche Cadmiumlampe bei 229nm arbeiten.

Abb. 3 zeigt das theoretische Absorptionsverhalten der fünf interessierenden Hormone. Es sind bereits hier erhebliche Unterschiede in der Absorptionsintensität und der Lage der Absorptionsmaxima zu verzeichnen. (Siehe 2.2.2.2.)

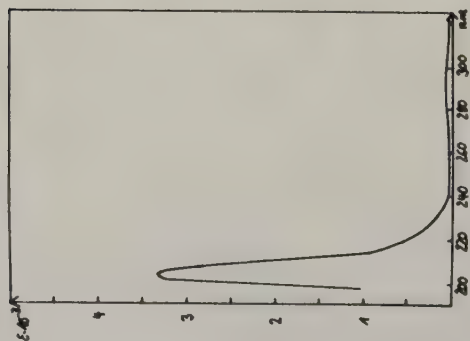
ABSORPTIONSMAXIMA

VON

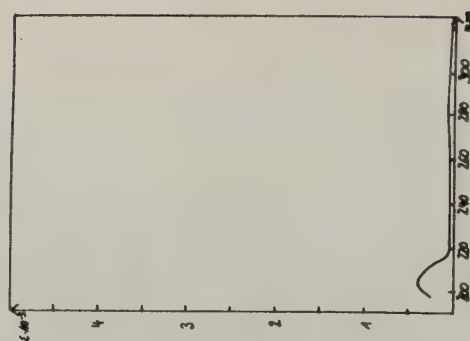
$\Delta_4, T, 17\alpha\text{-OH-P}$



DHEA



DHT



nach H. Mander, H. Rapp, 1965
STEROID-SPEKTRENTLAS

ABB. 3 ABSORPTIONSMAXIMA VON $\Delta_4, T, 17\alpha\text{-OH-P}$, DHEA, DHT

2.2.2.1.5. Laufmittel

In der reversed-phase-Chromatographie werden heute hauptsächlich binäre Gemische aus organischen Laufmitteln - meist Methanol oder Acetonitril - mit Wasser benutzt.

1981 wiesen G.J.-L.Lee, R.M.K.Carlson und S.Kushinsky (38) auf die Möglichkeit einer besseren Auflösung durch Einsatz von ternären Gemischen hin. Die Zugabe des Äthers Tetrahydrofuran (THF) zu Methanol-Wasser-Gemisch führt auch zur erfolgreichen Trennung der fünf interessierenden Hormone. (Siehe 2.2.2.2.)

Zu bedenken ist für alle in der UV-Detektion verwendeten Eluenten, daß sie möglichst im gesamten UV-Bereich völlig lichtdurchlässig sein sollen. Absorbiert das Laufmittel selbst, kann das eine Verschlechterung der Nachweisempfindlichkeit zur Folge haben.

Bei 254nm und 229nm zeigen alle von uns benutzten Komponenten völlige Lichtdurchlässigkeit. Bei 214nm beginnt als einziges Laufmittel Tetrahydrofuran zu absorbieren. Dies mag unter Umständen in geringem Maß zu einer verschlechterten Nachweisbarkeit bei 214nm führen.

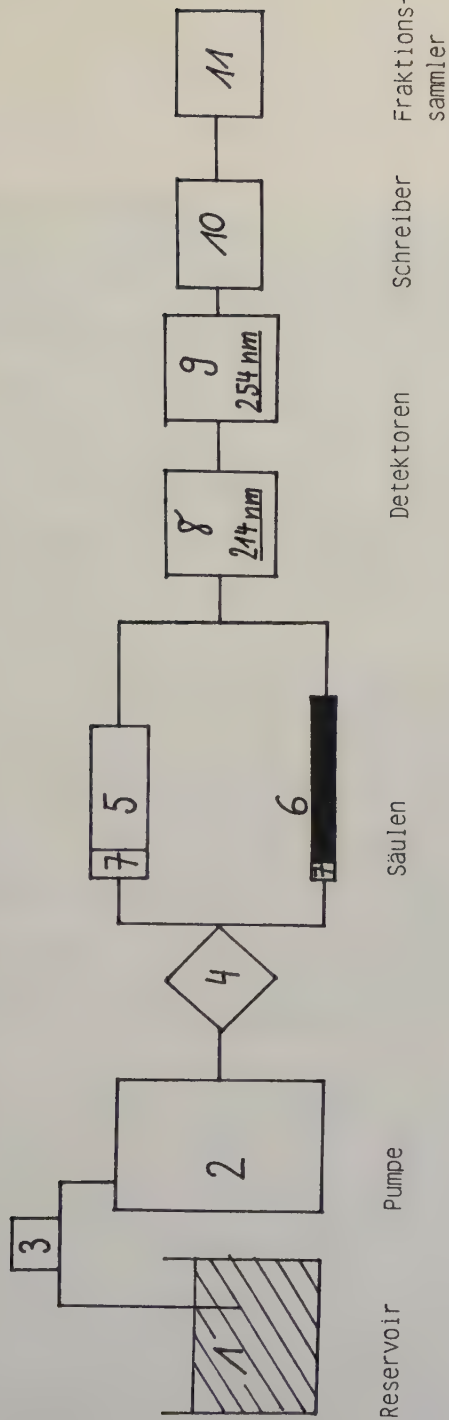
Als Standardlösungsmittel zur Bestimmung des Absorptionsmaximums gilt Äthanol; in Methanol erfahren konjugierte Ketone demgegenüber keine Absorptionsverschiebung. Testosteron z.B. hat in Äthanol und Methanol sein Absorptionsmaximum bei 241nm, in Hexan bei 230nm, in Wasser bei 249nm. (45) Eine Angabe des Absorptionsmaximums ohne Angabe des Lösungsmittels ist somit nur bedingt verwertbar.

Sämtliche für die HPLC verwendeten Laufmittel müssen von sehr hohem Reinheitsgrad sein. Sie sind unter der Bezeichnung "HPLC-grade" oder "für die Chromatographie" erhältlich.

Auf Aufbewahrung in braunen Flaschen ist zu achten, da manche organischen Lösungsmittel (z.B. Acetonitril) lichtempfindlich sind.

Das hergestellte Laufmittelgemisch wird in spezieller Flasche mit Filteraufsatz vor Gebrauch mit der Wasserstrahlpumpe entgast. Entgast wird nie länger als 5 Minuten, um einer Änderung der Laufmittelzusammensetzung durch unterschiedliche Flüchtigkeit der Bestandteile vorzubeugen. Der Eluent wird während des Laufs über Spezialfritten von der Pumpe angesaugt.

SCHEMA EINER HPLC-ANLAGE



- ABB. 4 -

2.2.2.1.6. Abb. 4 zeigt schematisch den Aufbau unserer HPLC-Anlage

Das Laufmittelgemisch (1) wird von einer Doppelkolbenpumpe (2) in konstantem Strom gefördert. Das gesamte Schlauchsystem muß völlig luftfrei sein. Die Flußrate wählt man im Bereich von 0,1ml/min - 10ml/min. Durch einen manuellen Injektor (3) wird die Probe in den konstanten Laufmittelstrom mit Hilfe von speziellen, gasdichten Luer-Lok-Spritzen injiziert.

Über ein 6-Wege-Ventil (4) lassen sich alternativ entweder eine der radial-komprimierten Säulen (5) oder eine Stahlmantelsäule (6) ansteuern. Eine Vorsäule (7) soll die Säule vor Verunreinigungen schützen. Verläßt ein Probestandteil die Säule, gelangt er in zwei hintereinandergeschaltete Detektorzellen (8,9).

Die UV-Absorption der Substanz führt zur Extinktionsänderung in der Detektorzelle, ein Signal wird erzeugt, das vom Schreiber (10) als Peak registriert wird. Der von uns benutzte Schreiber ist Bestandteil eines programmierbaren Rechners, welcher zum einen Speicherung und Ausdruck von Betriebsparametern und Retentionszeiten, zum anderen die Integration der Peakflächen und damit die Bestimmung der Probenkonzentrationen ermöglicht.

Ein ebenfalls programmierbarer Fraktionssammler (11) sammelt die Probe nach Verlassen der Detektorzelle zeit- oder volumengesteuert.

2.2.2.2. Ergebnisse

55 verschiedene Säulen- bzw. Laufmittelsysteme werden ausgetestet, bis eine befriedigende Trennung der fünf Hormone vorliegt.

2.2.2.2.1. Laufmittelwirkung

Abb. 5 zeigt den Einfluß der Laufmittelzusammensetzung auf die Trennung bei Verwendung ein und der selben Säule, in diesem Fall der C₈-Kartusche.

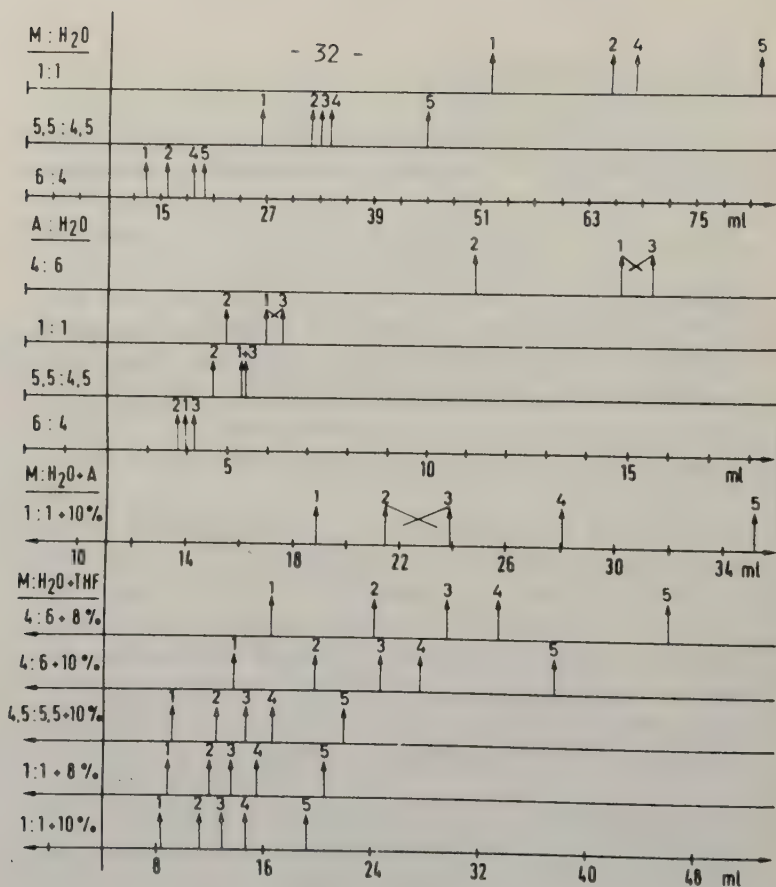


ABB.5 VARIATION DER HPLC-LAUFMITTEL

Pfeil = Hormonpeak

1 = Androstendion

2 = Testosteron

3 = 17 α -OH-Progesteron

4 = Dehydroepiandrosteron

5 = Dihydrotestosteron

sich überkreuzende Pfeile = nicht getrennte Peaks

M = Methanol

A = Acetonitril

THF = Tetrahydrofuran

Die eindimensionale Darstellung zeigt die Retentionsvolumina in ml. Bei Flußgeschwindigkeiten von 1ml/min entsprechen sie den Retentionszeiten in Minuten.

- Zunächst wird die Trennung mit BINÄREN Gemischen versucht. Erhöhung des Methanol- bzw. Acetonitrilanteils, also der unpolaren Komponente, beschleunigt die Analysezeiten erheblich:

Veränderung des Methanolgehalts von 1:1 auf 6:4 im Verhältnis zu Wasser z.B. verkürzt die Retentionszeit auf weniger als ein Drittel.

In Methanol-Wasser-Gemischen bleiben die Retentionszeiten lang, die Peaks folgen für eine gute Fraktionierung zu dicht aufeinander, v.a. Testosteron und 17 α -OH-Progesteron bleiben ungetrennt.

- Acetonitril-Wasser-Gemische verfügen über eine wesentlich stärkere Elutionskraft. Bei gleichem Wasseranteil eluieren die Substanzen erheblich früher. Die Auflösung ist schlechter:

Die Peakfolge ist dichter, Androstendion und 17 α -OH-Progesteron eluieren in einem gemeinsamen Peak.

Interessant ist die Umkehrung der Elutionsfolge in Acetonitrilgemischen:

Hier folgt Androstendion auf Testosteron, während in Methanolgemischen Androstendion als frühestes, "polarstes" Hormon eluiert.

Bezugnehmend auf eine Veröffentlichung von Lee et.al. 1981 (Siehe 2.2.2.1.5., 38) testen wir TERNARE Laufmitelgemische aus.

Zusatz von Acetonitril zu Methanol-Wasser-Gemischen führt zu keiner Verbesserung der Trennung. Auch hier bleibt ein gemeinsamer Peak von Testosteron und 17α -OH-Progesteron.

Hoher Wasseranteil hat, wie generell zu beobachten ist, eine Bandenverbreiterung zufolge: selbst weit aufeinanderfolgende Peakmaxima führen nicht zu ausreichender Auflösung.

Mit Tetrahydrofuran (THF) als Zusatz zu Methanol-Wasser-Gemischen im Bereich von 8-10 Volumenprozent zeigt sich eine vollständige Trennung der fünf Hormone. Bei einem Verhältnis von Methanol : H_2O = 4,5 : 5,5 + 10% THF ist der für uns optimale Kompromiß zwischen kurzen Retentionszeiten und guter Peakauflösung gefunden.

Bei THF-Anteilen unter 3 Vol.% und über 10 Vol.% ist die Trennung der Peaks nicht mehr zu erzielen.

2.2.2.2.2. Wirkung unterschiedlicher Säulen

Abb. 6 zeigt das Elutionsverhalten der Steroide auf vier unterschiedlichen Säulen.

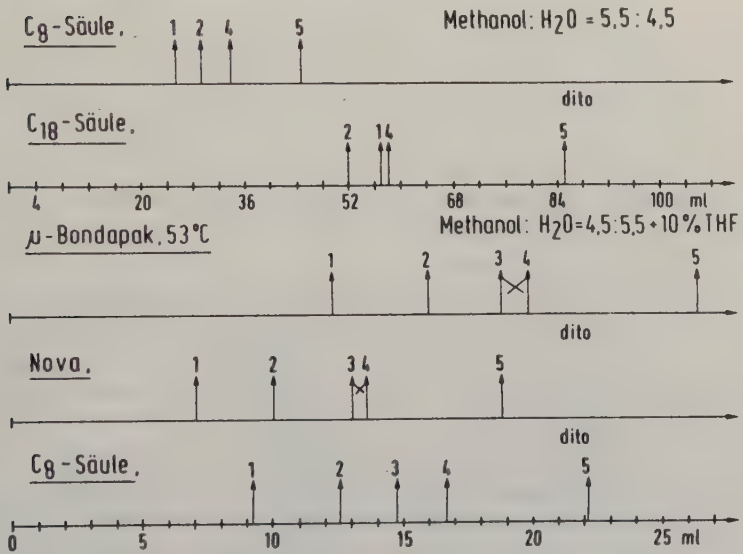


ABB.6 VARIATION DER HPLC-SÄULEN

Pfeil = Hormonpeak

sich überkreuzende Pfeile = nicht getrennte Peaks

1 = Androstendion

2 = Testosteron

3 = 17α -OH-Progesteron

4 = Dehydroepiandrosteron

5 = Dihydrotestosteron

- Die längere Kohlenstoffkette des Octadecylsilan-materials führt zu einer mehr als doppelt so langen Retentionszeit auf der C_{18} -Säule im Vergleich zur C_8 -Säule. Die Retentionszeiten auf μ -Bondapak-, Nova- und C_8 -Säule sind nicht wesentlich verschieden.

- Das C_8 -Material läßt Androstendion in Methanol-Wasser-Gemischen als erstes Hormon eluieren, während die Wechselwirkung mit dem C_{18} -Material größer zu sein scheint:

hier eluiert Testosteron als früheste Komponente. Bei sonst völlig gleicher Struktur beider Hormone trägt Testosteron lediglich anstelle der konjugierten Ketogruppe des Androstendions an C_{17} eine Hydroxygruppe. (Abb. 15)

Eine größere Polarität von Testosteron wäre somit zu erwarten. (Siehe 2.2.2.1.1., 39)

Der Polaritätsunterschied ist offensichtlich jedoch so gering, daß er von Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Packmaterialien und Eluenten aufgewogen wird.

- Hauptproblem ist auch hier die Trennung von 17α -OH - Progesteron und DHEA. Bei sonst guter Auflösung ist sie weder mit der μ -Bondapak-Stahlmantelsäule im Wärmeofen bei 53°C noch mit der radial-komprimierten Nova-Säule zu erzielen. In Methanol : $\text{H}_2\text{O} = 4,5 : 5,5 + 10\%$ THF trennen jedoch sowohl die C_8 - als auch die C_{18} -Säule die Hormone vollständig. Die C_8 -Säule ist der C_{18} -Säule durch die kürzeren Retentionszeiten überlegen.

2.2.2.2.3. Absorptionsverhalten der Hormone

Wie Abb.7 zeigt, ist das Absorptionsverhalten der fünf Hormone sehr unterschiedlich.

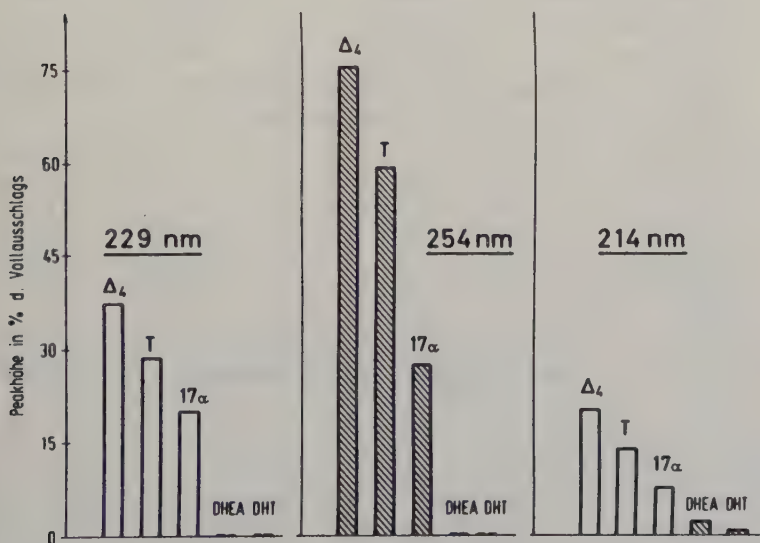


ABB.7 ABSORPTIONSVERHALTEN BEI DREI WELLENLÄNGEN

Die aufgetragenen Peakhöhen entsprechen gleichen Absolutmengen an Hormon bei identischer Detektionsempfindlichkeit.

- Während Androstendion ($\Delta 4$), Testosteron (T), 17α -OH-Progesteron (17α -OH-P) bei 254nm ihr Absorptionsmaximum haben, liegt es für Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Dihydrotestosteron (DHT) bei 214nm.
- Die Absorptionsintensität von DHEA und DHT ist weitaus geringer. Bei 254nm sind beide Hormone nicht nachweisbar.
- Auch die Verwendung der Wellenlänge 229nm ist nicht günstiger;
Die Absorptionsintensität von $\Delta 4$, T, 17α -OH-P ist bereits deutlich schwächer, DHEA und DHT sind auch hier nicht nachweisbar.

Um alle fünf Hormone simultan erfassen zu können, messen wir somit bei 214nm Wellenlänge.

2.2.2.2.4. Elutionsprofile

Abb.8 zeigt die Trennung der Hormonstandards bei 254nm Wellenlänge.

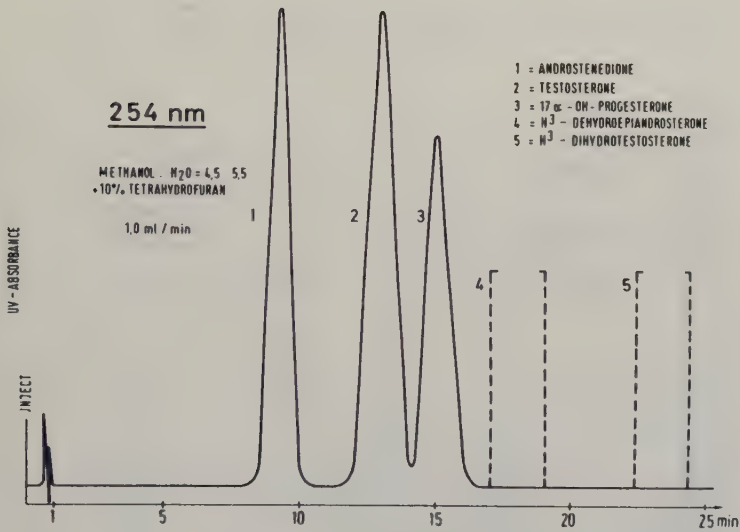


ABB.8 HPLC-TRENNUNG BEI 254 nm WELLENLÄNGE

Die Lokalisation des DHEA- und DHT-Peaks (4 und 5) erfolgt durch Zugabe von tritierten Hormonen, Fraktionierung des Eluats und anschließender Aktivitätsbestimmung im β -Counter.

Abb. 9 zeigt dieselbe Trennung bei 214nm.

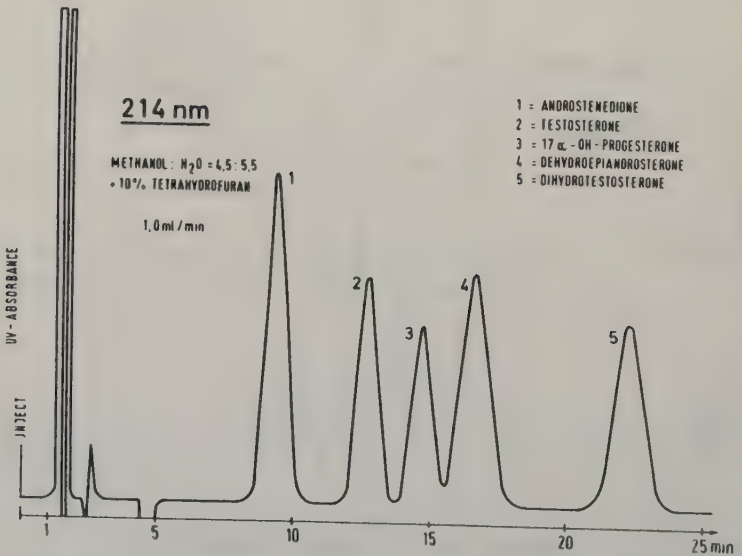


ABB. 9 HPLC-TRENNUNG BEI 214 nm WELLENLÄNGE

- Die Hormone sind gut getrennt.
- Die Trennung ist in weniger als 30 Minuten vollzogen.

Die Peaks entsprechen je 1,5µg $\Delta 4$, T, 17α -OH-P, 7,6µg DHEA und 37,9µg DHT. (50µl einer Hormonstandardlösung in Methanol, Konzentration 1mg/ml, enthält $\Delta 4$: T : 17α -OH-P : DHEA : DHT = 2 : 2 : 2 : 10 : 50). Die Messung erfolgt bei mittlerer Empfindlichkeit.

- Änderung der Durchflußgeschwindigkeit im Bereich von 0,7ml/min - 1,5ml/min führt zu keiner feststellbaren Änderung der Auflösung.
- Die Peakbreite liegt für $\Delta 4$ bei 1,0ml - 1,2ml, für T, 17α -OH-P und DHEA bei 1,2ml - 1,4ml, für DHT bei 1,8ml - 2,0ml.
- Die Reproduzierbarkeit der Trennung ist zuverlässig. Die Retentionszeiten in Methanol : H₂O = 4,5 : 5,5 + 10% THF liegen

für	bei
$\Delta 4$	$\bar{x} = 9,54\text{ml} \pm 0,45\text{ml}$, VK = 4,8%, n=8
T	$\bar{x} = 13,00\text{ml} \pm 0,67\text{ml}$, VK = 5,2%, n=8
17α -OH-P	$\bar{x} = 15,40\text{ml} \pm 1,03\text{ml}$, VK = 6,7%, n=8
DHEA	$\bar{x} = 16,60\text{ml} \pm 0,84\text{ml}$, VK = 5,1%, n=7
DHT	$\bar{x} = 22,50\text{ml} \pm 1,11\text{ml}$, VK = 4,9%, n=7.

$\bar{x}$ = Mittelwert der Retentionszeiten, n = Anzahl der Trennungen, VK = Variationskoeffizient
Der Variationskoeffizient gibt die Standardabweichung σ in Prozent des Mittelwerts an, er ist die relative Standardabweichung:

$$\pm \sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{VK \%} = \frac{\sigma \cdot 100}{\bar{x}}$$

2.3. Integration

2.3.1. Methode

Integration bedeutet in der Mathematik die Berechnung einer von einer Kurve eingeschlossenen Fläche.

Die chromatographische Aufzeichnung von Peaks führt zu flächeneinschließenden Kurven.

Der von uns verwendete Integrator dient gleichzeitig als Schreiber, Rechner und Druckgerät.

- Er empfängt das Detektorsignal
- transformiert es in digital erfassbare Ziffern
- entscheidet über das Vorhandensein von Peaks
- speichert die Daten erkannter Peaks, wie Beginn, Ende, Retentionszeit und Peakfläche bzw. -höhe
- zeichnet das Chromatogramm,
- druckt dessen Daten und Ergebnisse der Berechnungen aus.

2.3.1.1. Aufzeichnung und Ausdruck (73)

Der Integrator trägt an seiner Front die Tastatur zur Dateneingabe. 100 verschiedene Parameter können erfaßt werden.

Die Oberseite des Gerätes bildet den Schreiber. Der Papiervorschub kann von 0,01cm/min bis 20,0cm/min gewählt werden. Zwei Schreibköpfe ermöglichen die simultane Registrierung zweier Chromatogramme von verschiedener Wellenlänge. Daten und Integrationsparameter lassen sich jeweils nur für ein Chromatogramm speichern und zur Berechnung verwenden.

An der Rückseite des Integrators befinden sich die Eingangskanäle für Stromversorgung und Detektorsignale.

Nach Ablauf eines Chromatogramms wird die Aufzeichnung abgebrochen und der Ausdruck der Daten erfolgt. Mit deren Hilfe läßt sich die sog. Eichtafel erstellen, die der Berechnung der Probenkonzentration zugrunde liegt.

2.3.1.2. Transformation des Detektorsignals

Alle 100msec vollzieht der Integrator die Konversion des Detektorsignals in digitale Ziffern. Er transformiert die Höhe der Detektoranzeige in Volt (Arbeitsbereich von -10mV bis 2V) in Flächeneinheiten. 10mVsec Signalhöhe entsprechen dabei jeweils 5000 Flächeneinheiten bzw. 1 Flächeneinheit = 0,2µVsec Signalhöhe. Diese Transformation des Detektorsignals stellt die Integration dar. -10mV Detektorausschlag entsprechen 0 Flächeneinheiten, also der "Basislinie" des Integrators; bei 0mV, der Basislinie des Chromatogramms, weist der Integrator 5000 Flächeneinheiten nach. Die vom Integrator "gedachte" Basislinie und die des Chromatogramms sind also nicht identisch. Es erfolgt daher in jedem Lauf vor Ausdruck der Peakflächen automatisch die Berechnung der BASISLINIEN-KORREKTUR. Darüberhinaus wird in jedem Fall von nicht bis zur Basislinie aufgelösten Peaks eine weitergehende Korrektur notwendig.

2.3.1.3. Peakerkennung und -registrierung

Um Peaks von zufälligen Schwankungen des Detektorsignals zu unterscheiden, bedient sich der Integrator eines Schwellenwerts für die Steigung des ansteigenden Peakschenkels.

Der Schwellenwert errechnet sich aus den sog. Peak-erkennungsparametern wie folgt:

$$\text{Schwellenwert für die Steigung} = 3 \times (\text{Peakbreite})^2 \times \text{Wert für die Rauschunterdrückung}$$

Nur Peaks, deren Steigung den Schwellenwert übersteigt, werden als solche registriert.

In diesem Fall markiert ein abwärtsgerichtetes Startzeichen den Beginn, eine aufwärtsgerichtete Stopmarke das Ende des Peaks im Chromatogramm.

Die richtigen Werte für die Peakbreite und das Rauschen der Basislinie sucht sich der Integrator entweder selbst und paßt ihn anhand des jeweils zuvor eluierenden Peaks und der fortlaufenden Registrierung des Detektorsignals den gegebenen Bedingungen während eines Laufs flexibel an ("Automatische Parameter"). Von Vorteil ist dies v.a. beim ersten Lauf einer Analyse.

Die Peakerkennungsparameter können aber auch nach vorheriger Optimierung konstant eingegeben werden. Für eine reproduzierbare Integration nach etablierter Trennung ist dem der Vorzug zu geben.

Eine möglichst sorgfältige Optimierung dieser Parameter ist für die Richtigkeit der Integration entscheidend. Erster Schritt ist die Aufzeichnung eines Probechromatogramms.

Die Nachweisempfindlichkeit ist so zu wählen, daß alle interessierenden Peaks erfaßt werden.

2.3.1.3.1. Optimierung der Peakbreite

Der optimale Wert für die Peakbreite errechnet sich aus:

$$\text{Peakbreite (sec)} = \frac{\text{Peakbr. in halber Höhe (cm)} \times 60\text{sec/min}}{\text{Schreibergeschwindigkeit (cm/min)}}$$

Bei mehreren Peaks in einem Chromatogramm wird die Peakbreite gemittelt. Sie ist dabei eher abzurunden, da ihr Wert die doppelte Peakbreite des schmalsten Peaks nicht überschreiten soll.

Eine Kontrollmöglichkeit für die Güte des eingegebenen Werts ist im aufgezeichneten Chromatogramm zu finden:

Bei richtiger Vorgabe des Peakbreitenwerts zeigt sich eine Lücke im mittleren Drittel des abfallenden Peakschenkels.

Befindet sich die Lücke im oberen Drittel, ist die Peakbreite zu schmal vorgegeben; bei einer Lücke im unteren Drittel ist die eingegebene Peakbreite zu groß.

2.3.1.3.2. Optimierung der Rauschunterdrückung

Ausgemessen wird der größte Peak.

Die Höhe in cm in 10% der Gesamtpeakhöhe wird bestimmt. Im Idealfall entspricht ihr Wert der Distanz vom Startzeichen des Peaks zur Basislinie. Ist dies nicht der Fall, muß der Wert für die Rauschunterdrückung nach folgender Formel geändert werden:

$$\frac{10\% \text{ der Peakhöhe}}{\text{Abstand Startzeichen - Basislinie}} \times \text{vorheriger Wert} =$$

= neuer Wert für die Rauschunterdrückung

Bei zu klein vorgegebenem Wert für die Rauschunterdrückung werden fortlaufend entlang der Basislinie Retentionszeiten ausgedruckt und gespeichert. Ist der Wert zu groß, beginnt die Integration zu spät, die Peakfläche wird zu klein berechnet, bzw. der Peak wird nicht mehr als solcher erkannt.

2.3.1.3.3. Optimierung der Flächenunterdrückung

Peaks von kleiner Fläche werden nicht aufgelistet, um störende, bedeutungslose Peaks auszuklammern. Es gilt, einen der interessierenden Peakfläche angemessenen Ausschlußwert zu finden und den Parameter entsprechend zu ändern.

Der Flächenwert der interessierenden Peaks ist dem Probechromatogramm zu entnehmen.

2.3.1.4. Basislinienkorrektur

Der Integrator vollzieht nach jedem Lauf die Korrektur der Basislinie. Er ist in der Lage, verschiedene Peaktypen zu erkennen und die jeweils angebrachte Art der Basislinienkorrektur zu vollziehen.

Symbole im Ausdruck geben Aufschluß über die notwendigen Korrekturen und damit indirekt über die Verlässlichkeit des errechneten Flächenwerts.

2.3.1.5. Quantitative Bestimmung

2.3.1.5.1. Berechnungsmodi

Fünf Modi für die Berechnung des Probengehalts stehen wahlweise zur Verfügung:

a) Die Flächenprozentmethode

Die Peakflächen werden in Prozent der Gesamtfläche aller eluierten Peaks ausgedrückt. Es ist die einfachste Methode der Flächenberechnung. Voraussetzung ist, daß gleiche Injektionsmengen der Probestandteile jeweils gleiche Detektorantwort hervorrufen.

b) Bei unterschiedlicher Detektorantwort auf die einzelnen Probekomponenten ist die Methode der Normierung die einfachste:

nach Korrektur der unterschiedlichen Detektorantwort über einen sog. "response-factor" (RF) werden die einzelnen Peakflächen ebenfalls in Prozent der Gesamtfläche aller Peaks angegeben.

c) Genauere Ergebnisse bringt die Methode des Externen Standards. Sie berechnet die Probenkonzentration im direkten Vergleich zu einem zuvor im Eichlauf eluierten Standard bekannter Konzentration. Bei guter Reproduzierbarkeit von Probenaufbereitung und Injektionsvolumen ist die Genauigkeit der Methode ausreichend.

d) Die Methode des Internen Standards.

Die Berechnung entspricht der nach der Externen-Standard-Methode. Zusätzlich wird hier eine der interessierenden Probe chemisch verwandte Substanz in bekannter Menge bereits zum ersten Schritt der Probenaufbereitung zugefügt. Dieser "Interne Standard" muß als deutlicher, gut aufgelöster Peak im Chromatogramm kenntlich sein. Verglichen wird die Fläche des Internen-Standard-Peaks im Eichlauf mit seiner Fläche im Analysenlauf. Der daraus errechnete Faktor korrigiert die für die Probenbestandteile errechneten Werte. Es ist dies die genaueste Methode. Sie kompensiert Schwankungen in der Probenaufbereitung, im Injektionsvolumen, kleine Schwankungen der Detektorempfindlichkeit oder der chromatographischen Aufzeichnung. Die Substanz des Internen Standards darf keinesfalls von vornherein Probenbestandteil sein und darf keine Reaktion mit der Probe eingehen.

e) Methode der Standardaddition

Sie gilt als Alternativmethode, wenn kein Interner Standard zugefügt werden kann oder große Schwankungen in der chromatographischen Aufzeichnung auftreten (z.B. bei Interferenz der Probenmatrix mit dem Füllmaterial der Säule).

Bekannte Mengen der interessierenden Probe werden der unbekannten Probenmenge vor dem Lauf zugefügt. Das Verhältnis der Peakfläche vor und nach Zugabe der unbekannten Probenmenge ergibt den für die quantitative Bestimmung nötigen Berechnungsfaktor.

2.3.1.5.2. Berechnung nach dem Externen-Standard-Verfahren

Dies ist die von uns benutzte Methode.

Erster Schritt ist die Eichung des Systems. Dazu ist die Auftrennung eines der Probe entsprechenden Standards bekannter Konzentration in einem Eichlauf erforderlich.

Essentiell ist die Einhaltung ein und desselben Injektionsvolumens für alle Injektionen.

Das Abwiegen und Verdünnen der Standards muß mit peinlicher Genauigkeit vorgenommen werden. Der Eichlauf ist zugleich Kontrolle über die Güte der vorgegebenen Peakerkennungsparameter. Gegebenenfalls muß hier eine weitere Optimierung erfolgen.

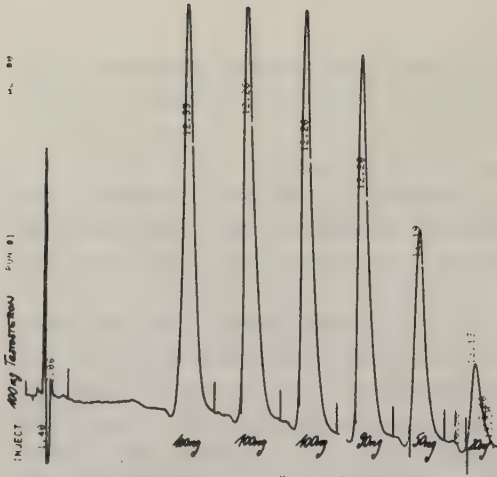
Im Eichlauf wird der "response-factor" (RF) berechnet:

$$RF = \frac{\text{Standardkonzentration}}{\text{Standardpeakfläche}} \times 1000$$

Es folgt der Analysenlauf.

Die Berechnung der Probenkonzentration geschieht wie folgt:

$$\text{Probenkonzentration} = \frac{\text{Peakfläche} \times \text{RF der betr. Substanz}}{1000}$$



INTEGRATIONS- BEISPIEL

Testosteronstandard
in
Methanol: H₂O = 45:55
+ 10 % Tetrahydrofuran

CHROMATOGRAPHY

PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	DF
1	100.00000	1.40	12.33	69795 HL	0.692400E-1
2				1444166 L	
3					
4					
5					

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	DF
1	101.73400	1.40	12.26	46084 HL	0.692400E-1
TOTAL	101.73400			1469295 L	

PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	DF
1	101.23600	1.40	12.26	30353 HL	0.692400E-1
TOTAL	101.23600			1462100 L	

PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	DF
1	88.77330	1.40	12.20	86030 F	0.692400E-1
TOTAL	88.77330			1202110 L	

PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	DF
1	49.67020	1.40	12.19	109650 F	0.692400E-1
2		2.86		11424 L	
3		5.06		7483 L	
TOTAL	49.67020			717470 L	

PEAK #	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	DF
1	12.62720	1.43	12.00	95795 F	0.692400E-1
2		2.33		1343 L	
3		10.13		1765 F	
4		10.46		6525 F	
5		12.13		204477 F	
TOTAL	12.62720			9757 F	

2.3.2. Ergebnisse

2.3.2.1. Integrationsbeispiel

Es werden nacheinander in je 10 μ l Volumen 3 x 100ng, 1 x 90ng, 1 x 50ng und 1 x 20ng Testosteronstandard, gelöst in Methanol, injiziert.

Laufmittel ist Methanol : H₂O = 4,5 : 5,5 + 10% THF. Gemessen wird bei 254nm Wellenlänge.

Die Flußgeschwindigkeit ist 1ml/min, die Schreiber-geschwindigkeit 1cm/min.

Die Integration erfolgt nach der Methode des Externen Standards

Der 1.Lauf ist der Eichlauf.

Aus der Standardmenge von 100ng und der Standardpeak-fläche berechnet der Integrator den response-factor (RF).

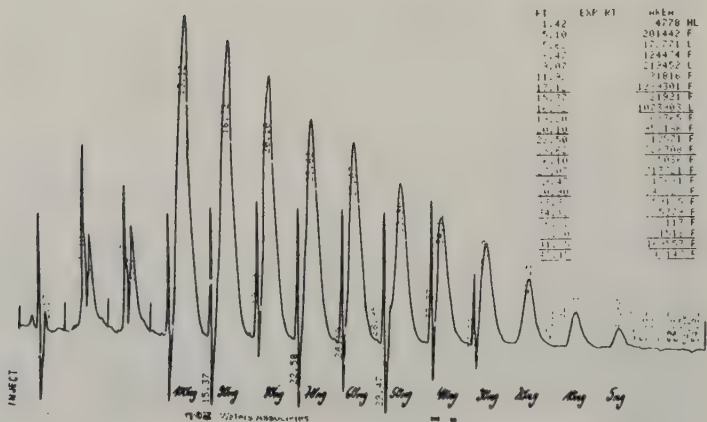
Die Retentionszeit des Eichpeaks liegt bei 12,33min. Mit einem Spielraum von $\pm$ 10% werden die in diese Retentionszeit fallenden Peaks der Analysenläufe berechnet.

Die Lage der Start- und Stopmarkierungen der Peaks ist richtig. Die Lücke im abfallenden Schenkel (entspr. der Stelle des Ausdrucks der Retentionszeit) liegt am Übergang zwischen mittlerem und oberem Peakdrittel, d.h. der gewählte Peakbreitenwert liegt an der unteren Grenze.

Die Peakintegration trägt das Symbol L für gut aufgelöste Peaks, lediglich der kleinste Peak (Symbol F) erscheint als nicht völlig aufgelöst und erfährt eine vertikale Basislinienkorrektur.

Die errechneten Werte für die Analysenläufe sind:

Bei Injektion von 100ng:	101,734ng,	Abweichung:	+1,73%
" " " 100ng:	101,236ng,	"	+1,24%
" " " 90ng:	88,773ng,	"	-1,37%
" " " 50ng:	49,678ng,	"	-0,64%
" " " 20ng:	19,697ng,	"	-0,15%



TESTOSTERON

Methanol:H₂O=4:5:5.5+10%THF

ABB.11 HPLC VON TESTOSTERONSTANDARD
IN KONZENTRATIONEN VON 100 ng - 5 ng

2.3.2.2. Nachweisgrenzen und Serumkonzentrationen

Abb. 11 zeigt die Genauigkeit der Peakregistrierung. In absteigender Konzentration werden nacheinander 100ng bis 5ng Testosteronstandard in je 10 μ l Volumen injiziert.

Die Konditionen der Trennung sind identisch mit denen der Abb. 10.

Die Messung erfolgt bei höchster Detektionsempfindlichkeit. Die zusätzlichen, scharf aufgelösten Peaks entsprechen Artefakten, die durch die manuelle Injektion zustande kommen.

Die Linearität der Darstellung ist deutlich.

Der Abstand der einzelnen Injektionen beträgt ca. 3min.

Es zeigt sich, daß die Nachweisgrenze für Testosteron bei ca. 10ng liegt. Der 5-ng-Peak wird bei niedrigem Rauschunterdrückungswert (siehe Ausdruck von Retentionszeiten entlang der Basislinie) zwar noch als solcher erkannt, aber seine Fläche wird nicht mehr integriert.

Diese untere Nachweisgrenze von 10ng für Testosteron gemessen bei 254nm entspricht der Nachweisgrenze von Androstendion und 17 α -OH-Progesteron. Bei 214nm Wellenlänge verschlechtert sich die Nachweisgrenze dieser drei Hormone auf ca. 30ng.

Die Nachweisgrenze für DHEA - nur messbar bei 214nm - liegt bei ca. 200ng, für DHT - ebenfalls nur bei 214nm messbar - bei ca. 300ng.

2.4. Extraktion

Drei verschiedene, in der Steroidanalytik mehrfach angewandte Extraktionsverfahren (2,52,65,74) werden von uns erprobt:

1. Die klassische flüssig-flüssig Extraktion durch Ausschütteln von Serum in organischen Lösungsmitteln.
2. Flüssig-fest Verfahren auf Kieselgur (Extrelut^R)
3. Reversed-phase Extraktion auf C₁₈ - Material

Im Folgenden die von uns gemachten Erfahrungen.

2.4.1. Quench - Effekt

Die Bestimmung der Wiederfindungsrate der Steroide geschieht durch Zugabe von radioaktiv markierten Hormonen und Strahlungsmessung vor und nach Extraktion.

Die von uns verwendeten radioaktiven Hormone (Tracer) sind mit Tritium (³H) markiert.

Der Zerfall von Tritium geschieht wie folgt (59):



Tritium	Helium
1 Proton	2 Protonen
2 Neutronen	1 Neutron

Bei dieser Umwandlung eines Neutrons zu einem Proton ändert sich das Atomgewicht (3) nicht, die Kernladungszahl (1 bzw. 2) nimmt um eins zu. Frei wird außerdem ein Elektron und ein sog. Anti-Neutrino.

Diese beiden Teilchen machen die β -Strahlung aus. Der β -Strahler Tritium zerfällt mit einer Energie von 20KeV und einer Halbwertszeit von 12,25 a.

β -Strahlung hat nur eine sehr geringe Reichweite von einigen Millimetern. Dies ist der Grund, warum ihre Messung durch Zugabe von Szintillationsflüssigkeit (organische Verbindungen, z.B. Naphthalin) zur Probe erfolgen muß. Ein Teil der Energie der β -Partikel wird an Szintillationsmoleküle abgegeben, diese werden angeregt und geben die aufgenommene Energie in Form von Lichtquanten ab. Mehrfache Verstärkung macht die Strahlung mit dem β -Counter (=Zähler) erfaßbar.

Die Wechselwirkung zwischen Szintillationsflüssigkeit und Lösungsmittel der Probe hat Einfluß auf die Höhe des Energietransfers.

Führt diese Wechselwirkung, z.B. durch Bildung von Emulsionen, zu einer erniedrigten Messung der Strahlungsrate, spricht man vom sog. "QUENCH" - Effekt.

Mißt man z.B.:

100 μ l eines in Äthanol gelösten 3 H-Testosteron-Tracers	+ 3ml Szintillationsmittel
--	----------------------------

so ist die gemessene Aktivität 3577 cpm.

100 μ l Tracer + 100 μ l H ₂ O	+ 3ml Szintillationsmittel erzielen
	2607 cpm

100 μ l Tracer + 100 μ l LM ₁)	+ 3ml Szintillationsmittel erzielen
	2473 cpm

100µl Tracer + 100µl Serum + 3ml Szintillations-
mittel erzielen
2158 cpm.

1) LM = Lösungsmittel =
= Cyclohexan : Chloroform : Methanol = 8 : 1 : 1

In H₂O wird die Aktivität um 27,1% erniedrigt gemessen,
in LM " " " um 30,9% " " "
In Serum " " " um 39,7% erniedrigt gemessen.

Wir tragen dem Rechnung, indem wir zur Messung der Gesamtaktivität die eingesetzte Tracermenge mit dem Eluenten der Extraktion auf das Volumen bringen, das dem zur Bestimmung der Wiederfindung eingesetzten Extraktvolumen entspricht. Zu beiden Proben wird dieselbe Menge Szintillationsflüssigkeit gegeben.

2.4.2. Flüssig-flüssig Extraktion

durch Ausschütteln von Serum mit organischen Lösungsmitteln

2.4.2.1. Feststellung des optimalen Extraktionsmittelvolumens

Versuchsanordnung:

- 3 x 5 Röhrchen mit je 500 μ l Serum + ca. 15 000 cpm 3 H - Testosteron werden in aufsteigender Reihe mit je 3 x
1ml - 2ml - 3ml - 4ml - 5ml Diäthyläther versetzt.
- Sie werden über 5 min maschinell geschüttelt,
- anschließend bei 6000g über 5 min zentrifugiert.
- Nach 20 min bei -80°C erfolgt die Phasentrennung:
die extrahierten Hormone befinden sich im flüssigen Ätherüberstand.
- Aliquots zur Messung der Wiederfindung werden entnommen.
- Das Extrakt wird unter Schütteln evaporiert und
- anschließend resuspendiert.

Die Wiederfindung bei Extraktion mit

1ml Äther war im Mittel	$\bar{x} = 42,6 \pm 3,64\%$	VK = 8,5%,	n=3
2ml Äther " " "	$\bar{x} = 54,2 \pm 5,81\%$	VK = 10,7%,	"
3ml Äther " " "	$\bar{x} = 55,7 \pm 4,06\%$	VK = 7,3%,	"
4ml Äther " " "	$\bar{x} = 59,5 \pm 3,19\%$	VK = 5,4%,	"
5ml Äther " " "	$\bar{x} = 58,8 \pm 4,35\%$	VK = 7,4%,	"

- Die beste Wiederfindung ergibt sich bei Verwendung von 4ml - 5ml Äther.
- Die Wiederfindung bleibt mit ca. 60% unter den Erwartungen.

Die Inter-Assay-Schwankung für die Extraktion mit 4ml Äther ist:

Wiederfindung: $\bar{x} = 46,8\%$, $VK = 30,6\%$, $n = 6$.

Die Reproduzierbarkeit ist nicht ausreichend gut.

2.4.2.2. Verwendung verschiedener Extraktionsmittel

Ein Vergleich der Wiederfindung nach Extraktion mit je 4ml dreier verschiedener organischer Lösungsmittel zeigt:

Vor Resuspension

Äther	$\bar{x}$ = 35,3%, VK = 9,2%
Dichlormethan	$\bar{x}$ = 45,5%, VK = 4,8%
Essigsäureethylester : Hexan = 3 : 2	$\bar{x}$ = 41,2%, VK = 5,2%

n = 2

Nach Resuspension in 1ml H₂O

Äther	$\bar{x}$ = 36,1%, VK = 10,6%
Dichlormethan	$\bar{x}$ = 40,1%, VK = 15,3%
Essigsäureethylester : Hexan = 3 : 2	$\bar{x}$ = 36,6%, VK = 4,5%

- Die Wiederfindung ist mit Dichlormethan als Extraktionsmittel relativ am besten.
- Die Wiederfindung ist insgesamt ungenügend.
- Der Wiederfindungsverlust nach Resuspension in 1ml H₂O beträgt ca. 5%

Insgesamt ist diese Methode als Standardverfahren für die Steroidextraktion aufgrund geringer Wiederfindungsrate von kleiner 60% nicht geeignet. Die Reproduzierbarkeit ist unbefriedigend.

2.4.3. Flüssig-fest Extraktion auf Kieselgur

Bei dem verwendeten Material Extrelut^R handelt es sich um granulären Kieselgur von großem Porenvolumen. Das Material ist entweder gebrauchsfertig in Glas-säulen gepackt, oder als Pulver zur Eigenpräparation von Säulen, erhältlich.

2.4.3.1. Vorversuche

2.4.3.1.1. Probenverdünnung mit H₂O

Nach Angaben des Herstellers ist die Vorverdünnung der Proben - für Serum Verdünnung im Verhältnis 1 : 1 - ratsam.

Die verdünnte Probe wird auf die Extrelut^R-Säule aufgetragen und wirkt 10 - 15min lang ein.

Danach wird, abhängig von Probenmenge und Größe der Säulen, mit unterschiedlichen Volumina an organischen Lösungsmitteln extrahiert.

Eine dünne Kanüle am Auslaß der Säule dient der Flußverlangsamung.

Die wässrige Phase der Probe verbleibt auf der Säule; im lipophilen Eluat finden sich die extrahierten Steroide.

Wir verdünnen zunächst mit Wasser.

Je 500µl mit tritiiertem Testosteron versetztes Serum werden mit Wasser im Verhältnis 1 : 1 verdünnt. Extrahiert wird mit 6ml Äther.

Die Wiederfindung im Interassay beträgt:

$$\bar{x} = 72,1\%, \text{VK} = 13,3\%, n = 3,$$

Die Wiederfindung im Intraassay beträgt:

$$x = 60,7\%, \text{VK} = 3,5\%, n = 10.$$

Die Wiederfindungsrate ist niedriger als erwartet, die Reproduzierbarkeit ist gut.

2.4.3.1.2. Extraktion unverdünnter Proben

Wir versuchen, ohne Vorverdünnung zu einer eventuell besseren Wiederfindung zu kommen.

Je 1ml Serum, mit ^3H -Testosteron versetzt, wird mit je 6ml Äther extrahiert.

Die Wiederfindung beträgt: $x = 34,5\%$, $\text{VK} = 52,0\%$, $n = 8$

Die Wiederfindung ohne Probenverdünnung ist schlecht, ebenso die Reproduzierbarkeit.

2.4.3.1.3. Bestimmung des pH-Optimums

Phosphatpuffer pH 7,4 wird mit Natronlauge auf steigende pH-Werte eingestellt.

Je 500 μl mit ^3H -Testosteron radioaktiv markierten Serums werden 1 : 1 mit Phosphatpuffer unterschiedlichen pH-Wertes wie folgt verdünnt:

500 μl Serum + 500 μl Phosphatpuffer pH:	resultierender Gesamt-pH:	Wiederfindung n. Extraktion m. 15ml Äther:
7,4	7,83	57,7%
8	8,29	96,7%
9	8,47	97,9%
10	8,66	59,2%
11	9,20	49,0%
12	10,37	58,8%
13	12,0	63,7%

Es zeigt sich ein pH-Optimum der Extrelut^R-Extraktion im Bereich von pH 8,0 - 8,5.

Dieses Optimum läßt sich in der Regel durch 1:1 Verdünnung von Serum mit 0,1n Natronlauge einstellen.

2.4.3.1.4. Vergleich verschiedener Extraktionsmittel

Je 500µl Serum + ^3H -Testosteron wird 1 : 1 mit Phosphatpuffer pH 9 Verdünnt.

Extrahiert wird mit je 6ml Lösungsmittel.

Wiederfindung nach Extraktion mit

Äther	$\bar{x} = 91,0\%$
Dichlormethan	$\bar{x} = 71,5\%$
Essigsäureethylester : Hexan = 3 : 2	$\bar{x} = 59,1\%$
	$n = 2$

2.4.3.1.5. Evaporieren und Resuspendieren

Zur weiteren Probenverarbeitung ist das Verdampfen des Extraktionsmittels und die Resuspension in geeignetem Lösungsmittel notwendig. Wir evaporieren die extrahierten Proben unter Anlegen eines Vakuums und kontinuierlichem Schütteln.

Soll das Extrakt anschließend in sehr kleinem Volumen konzentriert werden, empfiehlt sich ein zusätzlicher Schritt:

Je 500µl Methanol werden zu den Extrakten gegeben, über 20 min wird kräftig geschüttelt und anschließend nochmals evaporiert. Danach kann in mindestens 100µl Volumen resuspendiert werden.

Zur Wahl des geeigneten Resuspensionsmittels vergleichen wir die Wiederfindung nach Resuspension mit je 3ml H_2O bzw. Methanol:

500µl Serum + ^3H -Testosteron + 500µl Phosphatpuffer pH9
Werden mit je 6ml Äther extrahiert.

Wiederfindung nach Resuspension in H_2O	66,7%
Wiederfindung nach Resuspension in Methanol	61,6%

2.4.3.2. Endgültige Methode

Extrelut^R-Material befindet sich zwischen zwei Filtern in Glasspritzen. Extrelut^R-Füllung von 10ml Volumen erlaubt die Extraktion von bis zu 3ml Probelösung mit 15ml Äther.

Für die Extraktion von bis zu 20ml verdünnten Serums verwenden wir den Inhalt einer gesamten Extrelut^R-Packung in einer für die Säulenchromatographie geeigneten Säule. 50ml Äther werden zur Extraktion benötigt. Aufsatz einer dünnen Kanüle dient der Flußverlangsamung.

Je 1,5ml Serum mit Zusatz von ³H-Testosteron-Tracer (ca. 20 000 cpm) wird 1 : 1 mit 0,1n NaOH verdünnt. Die Einwirkzeit nach Auftragen auf Kieselgur beträgt 10 - 15 min.

Die Extraktion erfolgt durch Zugabe von je 15ml Äther in ca. 20min.

Nach Evaporieren wird in 5ml H₂O resuspendiert. Aliquots zur Aktivitätsmessung werden entnommen.

Wiederfindung nach Resuspension:

$$\bar{x} = 87,7\%, \text{VK} = 7,7\%, n = 10$$

2.4.4. Reversed-Phase-Extraktion auf C₁₈-Kartuschen

Die verwendeten Sep pak^R-Kartuschen sind kleine Säulchen von ca. 1,5cm Länge und ca. 1cm Durchmesser.

Die Kartuschen werden auf Glasspritzen aufgesteckt. Die Probe wird in die Spritze gefüllt und mit einer Flußrate von 3ml/min (= 1 Tropfen/sec) über die vorkonditionierte Säule geschickt.

Unpolare Substanzen werden stärker retiniert als polare.

Demzufolge ermöglichen Spülschritte mit Wasser und polarem Lösungsmittel eine Vorreinigung, bevor die interessierenden Steroide mit unpolarem Lösungsmittel von der Säule eluiert werden.

Die Methode hat den Vorteil des geringen Zeitaufwands. Eine Extraktion dauert jeweils 2 - 3 min.

Sie läßt eine gute Anreicherung der Probe zu, da die Extraktion der Komponente von Interesse in der Regel in 2ml Extraktionsvolumen vollständig ist.

Wir haben die Kartuschen nicht zur Wiederverwendung regeneriert, obwohl deren Verwendbarkeit für bis zu 300ml Probelösung beschrieben ist. (55)

2.4.4.1. Vorversuche

Zur Bestimmung des Wiederfindungsverlustes nach jedem einzelnen Schritt sind auch hier jeder Probe mit Tritium radioaktiv markierte Hormone zugesetzt. (2.4.1.)

Zur Austestung wird, wenn nicht anders angegeben, generell radioaktives Testosteron verwendet.

2.4.4.1.1. Vorkonditionierung

Vom Produzenten wird zur optimalen Vorbereitung der Sep pak^R-Kartuschen die Spülung mit Methanol im ersten, mit Wasser im zweiten Schritt vor dem Auftragen der Probe empfohlen.

Das zu verwendende Methanolvolumen wird mit 2ml - 5ml, das Wasservolumen mit 5ml - 10ml angegeben. Bei Variation dieser Volumina zeigen sich nur relativ geringfügige Auswirkungen auf die Wiederfindungsrate. Vergleicht man unter sonst identischen Bedingungen den Aktivitätsverlust nach dem Probenauftrag bei Vorkonditionierung mit

a) 5ml Methanol und 10ml Wasser, n = 2

b) 2ml Methanol und 5ml Wasser, n = 2,

so zeigt sich ein um ca. 4% geringerer Wiederfindungsverlust bei Verwendung größerer Volumina. (Fall a) Wählt man Acetonitril anstelle von Methanol zur Vorkonditionierung, so ändert sich das Elutionsverhalten erheblich.

Unabhängig davon, ob im Anschluß mit Acetonitril-Wasser- oder mit Methanol-Wasser-Gemischen extrahiert wird, eluieren über 80% des betreffenden Hormons

bereits bei dem sonst als Spülschritt eingesetzten Mischungsverhältnis 1 : 1.

Die Durchführung eines für die Probenreinigung so wesentlichen Spülschrittes ohne größere Wiederfindungsverluste ist hier kaum noch möglich. Methanol bei der Vorkonditionierung durch Acetonitril zu ersetzen, ist daher nicht sinnvoll.

Gleiches gilt für Tetrahydrofuran. Auch die Vorkonditionierung mit 5ml Tetrahydrofuran und 10ml Wasser läßt die interessierenden Probenbestandteile zu 82% beim Mischungsverhältnis 1 : 1 eluieren.

Ersatz des Wassers durch 10ml Citratpuffer mit pH-Wert 3, - der pH-Wert, auf den die Probenserien letztlich eingestellt werden - bringt ebenfalls keinen Vorteil gegenüber der üblichen Vorkonditionierung. Bei Verwendung von Wasser sind die Verluste durch Probenauftrag um 4,1%, die Verluste durch den Spülschritt um ebenfalls 4,0% geringer.

Wir behalten daher die Vorkonditionierung mit 5ml Methanol und 10ml Wasser bei.

2.4.4.1.2. Probenverdünnung

Werden die Serumproben unverdünnt aufgetragen, so zeigt sich ein erheblicher Wiederfindungsverlust:

Er beträgt $\bar{x} = 70,1\%$, $VK = 2,53\%$, $n = 6$.

Versuche, die Adsorption der Hormone durch Verdünnung des Serums mit Wasser zu steigern, ergeben:

Wiederfindungsverlust bei Probenauftrag:

- in Verdünnung Serum : Wasser = 1 : 1 ; 59%
- in Verdünnung Serum : Wasser = 1 : 2 ; 68%
- in Verdünnung Serum : Wasser = 1 : 3 ; 72%.

Sowohl bei hoher, als auch bei stark herabgesetzter Probenviskosität sind die Verluste hoch. Am geeignetsten erscheint die Probenverdünnung im Verhältnis 1 : 1. Es gilt, zur Verbesserung der Probenhaftung, ihre Abhängigkeit vom pH-Wert zu überprüfen.

2.4.4.1.3. Optimierung des pH-Bereiches

Ein erster orientierender Versuch zeigt das Extraktionsverhalten in alkalischem und saurem Milieu.

A) Serum wird mit Puffer von pH 13 versetzt.

Beim Mischungsverhältnis Serum : Puffer = 1 : 1 resultiert pH 11,6, die Wiederfindung ist 21%.

In der Verdünnung Serum : Puffer = 1 : 2 resultiert pH 12,3 und eine Wiederfindung von 48%.

In der Verdünnung Serum : Puffer = 1 : 3 resultiert pH 12,5 und eine Wiederfindung von 53%.

B) Serum wird mit Puffer von pH 3 gemischt.

Bei der Verdünnung Serum : Puffer = 1 : 1 ist der pH 6,6, die Wiederfindung 10%.

In der Verdünnung Serum : Puffer = 1 : 2 ist der pH 6,3, die Wiederfindung 15%.

In der Verdünnung Serum : Puffer = 1 : 3 ist der pH 6,1, die Wiederfindung 20%.

Die Wiederfindung bei Extraktion gänzlich unverdünnten Serums beträgt 14%.

Die Wiederfindung von in Wasser 1:1, 1:2 und 1:3 verdünntem Serum von unverändertem pH beträgt jeweils 15%.

Die Wiederfindungsverluste ereignen sich in allen Fällen beim Auftragen der Probe auf die Kartuschen, trotz Einhaltung der vorgeschriebenen Flußrate. Die Adsorption der Hormone ist offensichtlich vom pH-Wert abhängig. In extrem alkalischen und extrem sauren Bereichen denaturieren die Serumproteine

mit hoher Wahrscheinlichkeit. Transportproteine der Steroide geben dann sowohl körpereigene als auch über Nacht inkubierte, radioaktiv markierte Hormone frei. Deren Adsorption an die Extraktions-säulen wird dadurch wohl erst ermöglicht.

Diese Konfigurationsänderung der Serumproteine vollzieht sich vermutlich - laut obigem Versuch - ab einem alkalischen Gesamt-pH von 12. In saurem Milieu ist oberhalb von pH 6 noch keine wesentliche Verbesserung der Wiederfindung zu erzielen.

Die Durchführung der Hormonextraktion aus zuvor mit Laugen auf steigende pH-Werte eingestellte Seren ergibt folgende Wiederfindung:

Serum : NaOH pH 8 = 1:3	ergibt eine Wiederfindung von 15%
Serum : NaOH pH 9 = 1:3	" " " " 38%
Serum : NaOH pH 10= 1:3	" " " " 39%
Serum : NaOH pH 11= 1:3	" " " " 36%
Serum : NaOH pH 12= 1:3	" " " " 30%
Serum : NaOH pH 13= 1:3	" " " " 77%
Serum : NaOH pH 14= 1:3	" " " " 83%

Bei Extraktion von zehn mit Natronlauge von pH 14 im Verhältnis 1 : 3 verdünnten Seren folgt eine durchschnittliche Wiederfindung von $x = 72,8\%$, $VK = 4,1\%$, $n = 10$.

Die Extraktion im sauren Milieu zeigt folgende Ergebnisse:

Serumproben werden mit 1n HCL (= Salzsäure) auf sinkende pH-Werte eingestellt und anschließend mit Wasser im Verhältnis 1 : 1 verdünnt.

Die Wiederfindungsraten sind:

Serum eingestellt

auf pH 7	: H ₂ O = 1 : 1	ergibt	24%	Wiederfindung
" pH 6,5	: H ₂ O = " "		25%	"
" pH 6	: H ₂ O = " "		26%	"
" pH 5,5	: H ₂ O = " "		26%	"
" pH 5	: H ₂ O = " "		37%	"
" pH 4,5	: H ₂ O = " "		36%	"
" pH 4	: H ₂ O = " "		72%	"
" pH 3,5	: H ₂ O = " "		82%	"
" pH 3	: H ₂ O = " "		87%	"

Die Wiederfindungsrate verbessert sich sowohl im extrem alkalischen, als auch im extrem sauren Bereich. Nach Angaben des Herstellers ist die Stabilität der Sep pak^R-Kartuschen im sauren Milieu gewährleistet, wohingegen starke Basen die Kartuschen schädigen können.

Die Extraktion bei pH 3 wird daher bevorzugt.

Die Einstellung des Serums auf pH 3 läßt sich wie folgt durchführen:

Zu 1ml unverdünntem Serum werden 700µl 0,1n HCL gegeben. Der pH-Wert liegt dann bei: 3,01

3,07 n = 3

3,09

Die Wiederholung der Extraktion von 1ml Serum unter Zugabe von 700µl 0,1n HCL und 300µl Testosteron-Tracerlösung bestätigt die zuvor erreichte Wiederfindung: Wiederfindung in 2ml Extrakt: 88,5% n = 2

93,3%

Der Verlust beim Probenauftrag beträgt hier nurmehr:

5,5% ; 3,5% ; n = 2 .

2.4.4.1.4. Optimierung der Spülschritte

Die Spülschritte in der Sep pak^R-Extraktion haben den Zweck, Verunreinigungen so vollständig wie möglich von den Säulen zu waschen, ohne die adsorbierte Hormonfraktion zu eluieren. Als Laufmittel zur Spülung sind daher im reversed-phase Verfahren Wasser und Mischungen aus Wasser und organischen Lösungsmitteln mit hohem Wasseranteil geeignet. Je lipophiler Störsubstanzen sind, desto schwieriger ist es, sie durch Spülschritte von den interessierenden Hormonen zu trennen und gleichzeitig eine gute Wiederfindungsrate zu wahren.

Es werden stets zwei aufeinanderfolgende Spülschritte durchgeführt:

- Im 1. Schritt wird reines Wasser verwendet.
Alle hydrophilen, wasserlöslichen Serumbestandteile wie Proteine, Aminosäuren, Zucker, Mineralien sollen dadurch entfernt werden.
- Es folgt im 2. Schritt Spülung mit Methanol-Wasser-Gemisch im Verhältnis 1 : 1.
Dies soll möglichst auch lipophilere Störsubstanzen, wie z.B. Fette, eliminieren. Eine Erhöhung des Anteils an lipophilem, organischem Lösungsmittel auf das Verhältnis Methanol-Wasser = 6 : 4 ist bei gleichen Spülvolumina mit einem 30% höheren Wiederfindungsverlust verbunden.

Der erste Spülschritt mit 3ml Wasser schmälert die Wiederfindung um ca. 3%.

Die Steigerung auf 10ml Wasser führt zu durchschnittlich 10,1% Wiederfindungsverlust, $n = 10$, VK = 36,7% bei Extraktion von je 10ml mit 0,1n HCL auf pH 3 (Ges.-Vol 17ml) eingestelltem Serum.

Bei Spülung mit 20ml H_2O liegt der Wiederfindungsverlust ebenfalls bei 10,9%, $n = 2$, VK = 5,9%.

Ersatz des Wassers durch 10ml Citratpuffer pH 3 im 1. Spülvorgang bringt keine Verbesserung.

Der Wiederfindungsverlust liegt hier um ca. 1% höher. (10,4% i. Ggs. zu 9,15%, $n = 1$)

Spülung im 2. Schritt mit Methanol : $H_2O = 1 : 1$ führt zu folgenden Wiederfindungseinbußen:

Bei einem Spülvolumen von 3ml:

Wiederfindungsverlust $\bar{x} = 7,8\%$, $n = 12$, VK = 37,6%.

Bei einem Spülvolumen von 10ml:

Wiederfindungsverlust $\bar{x} = 35,6\%$, $n = 10$, VK = 16,4%.

Die Spülung wird diesen Ergebnissen zufolge mit 10ml Wasser im ersten und mit 3ml Methanol : Wasser = 1 : 1 im zweiten Schritt durchgeführt.

2.4.4.1.5. Extraktion der Hormonfraktion

Die Elution der an Sep pak^R adsorbierten Hormone bedarf eines unpolaren Extraktionsmittels. Methanol-Wasser-Gemische von hohem Methanolanteil erfüllen diese Voraussetzung.

Um die interessierende Fraktion optimal anzureichern, ist die Extraktion in möglichst kleinem Volumen erwünscht. Zur selektiven Gewinnung der Hormone ist ein Mischungsverhältnis von Methanol und Wasser wichtig, das weder die nach Spülung evtl. noch verbliebenen polaren Verunreinigungen von der Säule löst, noch hochgradig unpolare Substanzen miterfaßt.

Extraktionsversuche mit Gemischen von steigendem Methanolanteil zeigen:

Bei Mischungsverhältnis Methanol : H₂O = 6 : 4 werden, um eine vollständige Wiederfindung zu erzielen, 10ml benötigt.

Bei einem Mischungsverhältnis Methanol : H₂O =

= 7 : 3 benötigt man 6ml

= 8 : 2 " " 5ml

= 9 : 1 " " 2ml um eine vollständige

Wiederfindung zu erzielen.

Bei Verwendung von reinem Methanol ist die Wiederfindung ebenfalls in 2ml vollständig.

Methanol-Wasser-Gemisch im Verhältnis 9 : 1 erfüllt die Anforderungen am besten.

Vergleichsweise wird die Extraktion mit anderen unpolaren Lösungsmitteln erprobt:

- Mit Acetonitril als Laufmittel gehen im 2. Spülschritt 81,3% der Aktivität verloren, die Wiederfindung im eigentlichen Extraktionsschritt beträgt 19,1%. Mit Tetrahydrofuran als Laufmittel beträgt der Verlust im zweiten Spülschritt 81,8%, bei einer Wiederfindung im Extraktionsschritt von 5,0%.
- Ersetzt man den H₂O-Anteil durch Säurelösung von pH 3, in dem Versuch, bei i.d. Fall alkalischer Serumaufbereitung durch Extraktion in saurem Milieu die Wiederfindung zu erhöhen, so beträgt die Wiederfindung 56,5%, n = 1, bei Verlusten durch Probenauftrag von 36,3%.

Im Vorversuch ist die Wiederfindung ab 2ml Extraktionsvolumen vollständig. (s.o.)

Fraktionierung von 2ml Methanol : H₂O = 9 : 1 in Einzelmengen à 200µl ergibt:

Der Elutionspeak der radioaktiv markierten Hormone beginnt nach der 3. Fraktion (= nach 400µl). Er geht mit der 7. Fraktion (= nach 1400µl) zu Ende. Es liegt nahe, im Sinn der optimalen Probenanreicherung in zwei Schritten zu extrahieren.

Nach Verwerfung der ersten 500µl des Extraktes muß der Hauptanteil der Aktivität im folgenden zu sammelnden Milliliter enthalten sein:

Die erste Fraktion à 500µl enthält:

6,2%

3,8%

3,0% der Ausgangsaktivität n = 3, $\bar{x}$ = 4,3%, VK = 38,5%.

Die zweite Fraktion à 1ml enthält:

82,3%

82,7%

75,2% der Ausgangsaktivität $n = 3$, $\bar{x} = 80,1\%$, $VK = 5,3\%$

Die dritte Fraktion à 500 μ l enthält:

2,0%

2,1%

1,7% der Ausgangsaktivität $n = 3$, $\bar{x} = 1,93\%$, $VK = 10,8\%$

Die Gesamtwiederfindung in 2ml Extravolumen beträgt:

90,5%

88,6%

79,9% $n = 3$, $x = 86,3\%$, $VK = 6,6\%$.

Verwirft man die erste Fraktion à 500 μ l und sammelt lediglich den folgenden Milliliter, so betragen die Wiederfindungsverluste in diesen Fällen zwischen 4,7% und 8,3%.

Diese Verluste sind abzuwägen gegen den Vorteil der Probenanreicherung in 50% des Extraktvolumens. Kleineres Volumen erleichtert sowohl die direkt anschließende quantitative Bestimmung, als auch die Weiterverarbeitung durch Evaporation mit geringeren Wiederfindungsverlusten bei Resuspension.

2.4.4.1.6. Extraktion unterschiedlicher Probenvolumina

Folgender Versuch veranschaulicht die Wiederfindungsergebnisse bei Variation des Probenvolumens um das 10-fache:

Serum wird mit Natronlauge von pH 14 im Verhältnis 1 : 3 verdünnt, 1ml bis 10ml des Gemisches werden extrahiert:

Bei 1ml Volumen (entspr. tatsächl. Serumgehalt von 0,33ml)	beträgt die Wiederfindung				75,6%.
Bei 2ml	"	"	"	"	72,2%.
Bei 3ml	"	"	"	"	76,8%.
Bei 4ml	"	"	"	"	70,5%.
Bei 5ml	"	"	"	"	70,7%.
Bei 6ml	"	"	"	"	71,1%.
Bei 7ml	"	"	"	"	75,1%.
Bei 8ml	"	"	"	"	67,1%.
Bei 9ml	"	"	"	"	73,4%.
Bei 10ml	"	"	"	"	75,0%.

(letzteres entspr. tats. Serumgehalt v. 3,33ml)

$n = 10$, $\bar{x} = 72,8\%$, $VK = 4,1\%$

Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen Anstieg der Serummenge um den Faktor 10 und Schwankungen der Wiederfindungsrate. (Korrelationskoeffizient $r = 0,40$)

Die vergleichende Zusammenstellung der Ergebnisse bei Extraktion von je 1ml Serum (+ 700 μ l 0,1n HCl = Ges.-Vol v. 1,7ml) und bei Extraktion von je 10ml Serum (+ 7ml 0,1n HCl = Ges.-Vol v. 17ml) bei pH 3 zeigt folgende durchschnittlichen Wiederfindungsraten:

Extraktion von je 1ml Serum:

$\bar{x}$ = 83,2%, VK = 7,13%, n = 3.

Extraktion von je 10ml Serum:

$\bar{x}$ = 81,7%, VK = 6,25%, n = 9.

2.4.4.1.7. Extraktion unterschiedlicher Hormone

Die vergleichende Extraktion der verschiedenen Steroide mit Sep pak^R wird in zwei unterschiedlichen pH-Bereichen durchgeführt:

- A) Zur Extraktion im alkalischen Bereich wird Serum mit Natronlauge von pH 14 im Verhältnis 1 : 3 verdünnt. Nach Zusatz von je ca. 5 000 cpm der betreffenden radioaktiv markierten Hormone werden je 3ml verdünnten Serums (entspricht je 0,75ml unbehandelten Serums) wie folgt extrahiert:

Nach Vorkonditionierung mit 5ml Methanol und 10ml H₂O, Spülung mit 10ml H₂O und 3ml Methanol : H₂O = 1 : 1, werden die Hormonfraktionen in je 2ml Methanol : H₂O = 9 : 1 eluiert.

Die Wiederfindungsraten betragen für:

Androstendion : 83,5%

DHEA : 91,4% n = 1 in allen Fällen

DHT : 71,7%

Testosteron : 82,5%.

- B) Bei analoger Extraktion von je 10ml mit 7ml 0,1n HCl auf pH 3 eingestelltem Serum nach Zusatz der betreffenden radioaktiv-Markierten Hormone ergeben sich folgende Wiederfindungen für:

Androstendion : 55,3% n = 1

17 α -OH-Progesteron : 79,4% n = 1

DHT : 69,4% n = 1

DHEA : $\bar{x}$ = 66,8% n = 4 VK = 3,0%

Testosteron : $\bar{x}$ = 85,9% n = 4 VK = 1,9%.

2.4.4.2. Endgültige Methode

Zusammenfassend geht die Extraktion der fünf interessierenden Steroide aus dem Serum mit C_{18} -reversed-phase-Kartuschen letztendlich folgendermaßen vor sich:

- Die Kartuschen werden mit 5ml Methanol und 10ml H_2O vorkonditioniert.
- Unter Durchfluß von maximal 1 Tropfen/sec. wird die mit 0,1n HCl auf pH 3 eingestellte und mit Tracer markierte Serumprobe aufgetragen.
- Es folgt ein erster Spülschritt mit 10ml H_2O , ein zweiter Spülschritt mit 3ml Methanol : H_2O = 1 : 1.
- Die Extraktion geschieht mit Methanol : H_2O = 9 : 1.

Die dabei am Beispiel des Testosteron erzielten Wiederfindungsraten sind:

- a) Bei Extraktion aus je 1ml Serum in 2ml Methanol : H_2O = 9 : 1:

88,5%

93,3%

86,5%

$x = 89,4\%$, $n = 3$, $VK = 3,9\%$

- b) Bei Extraktion aus je 1ml Serum in 1ml Methanol :
H₂O = 9 : 1: (wobei die ersten 500µl des Eluats
verworfen werden; siehe S.78)

89,5%

77,7%

82,5%

$$x = 83,2\%, n = 3, VK = 7,13\%$$

- c) Bei Extraktion aus je 10ml Serum in 2ml Methanol :
H₂O = 9 : 1:

88,6%

79,9%

90,5%

86,0%

82,0%

$$x = 85,4\%, n = 5, VK = 5,18\%$$

- d) Bei Extraktion aus je 10ml Serum in 1ml Methanol :
H₂O = 9 : 1: (nach Verwerfen der ersten 500µl des
Eluats)

86,8%

83,8%

87,6%

85,4%

82,7%

75,2%

82,3%

78,7%

72,9%

$$x = 81,7\%, n = 9, VK = 6,25\%$$

2.4.5. Kombination der Extraktionsverfahren

Ziel der extrahierenden Serumaufbereitung ist neben der Hormonanreicherung die Gewinnung von für die Trennung mit der HPLC ausreichend reinen Proben.

Bei dem Versuch, das an Hormonstandards optimierte HPLC-Trennverfahren auf die Hormone der C₁₈-reversed-phase-Extrakte anzuwenden, zeigt sich die Überlagerung der Hormonpeaks durch Störsubstanzen höherer und gleicher Polarität.

Die in einem einzigen Extraktionsgang erzielte Probenreinigung ist ungenügend - ein in der Steroidanalytik wohlbekanntes Problem. (52,74)

Durch Kombination der erprobten Extraktionsverfahren soll im folgenden die Reinheit der Extrakte erhöht werden.

2.4.5.1. Kombination der Extraktion durch Ausschütteln in organischen Lösungsmitteln mit dem Sep pak^R-Verfahren

Die flüssig-flüssig Extraktion durch Ausschütteln wird wie beschrieben (2.4.2.) ausgeführt; Lösungsmittel sind Äther bzw. Dichlormethan, bzw. Essigsäureethylester ; Hexan = 3 : 2.

Es folgt im zweiten Schritt Extraktion mit der Sep pak^R-Methode: (2.4.4.2.)

Die Gesamtwiederfindung der zunächst mit Äther extrahierten Proben beträgt :

28,3% $\bar{x} = 30,5\%$, $n = 2$
32,6%

die der zunächst mit Dichlormethan extrahierten Proben:

38,4% $\bar{x} = 34,9\%$, $n = 2$
31,3%

und die der zunächst mit Essigsäureethylester :
Hexan = 3 : 2 extrahierten Proben:

29,0% $\bar{x} = 31,0\%$, $n = 2$.
32,9%

Die Wiederholung obiger Extraktionskombination mit Äther als Lösungsmittel und Resuspension des verdampften Extrakts anstatt in Wasser in Citratpuffer von pH 3 vor dem Sep pak^R-Schritt ergibt eine Gesamtwiederfindung von nur mehr 19,6%, $n = 1$.

Die resultierenden Wiederfindungen sind, unabhängig von dem Reinheitsgrad der Extrakte, unbefriedigend. Die weitere Analyse mit HPLC scheidet aus.

2.4.5.2. Kombination von flüssig-fest Extraktion auf Kieselgur und Sep pak^R-C₁₈-reversed-phase-Verfahren

Der folgende Versuch soll über die Reinheit der mit Kombination von Extrelut^R - (2.4.3.) und Sep pak^R-Verfahren (2.4.4.) zu gewinnenden Extrakte informieren:

Testosteronstandard in einer Konzentration von 100ng/ml wird dem Poolserum zugesetzt, um einen deutlichen Peak in der HPLC zu erzielen. 500µl dieses Serums, entsprechend einem Testosterongehalt von 50ng, wird nach Tracerzusatz mit H₂O 1 : 1 verdünnt.

Nach Einwirken der Probe über 10 min auf Extrelut^R, wird mit 6ml Äther extrahiert, evaporiert und in 1ml Citratpuffer von pH 3 resuspendiert.

Die übliche Sep pak^R-Extraktion in 1ml Methanol : H₂O = 9 : 1 folgt.

Die Wiederfindung nach beiden Schritten ist in diesem Fall 46,6%.

Das Extrakt wird nochmals verdampft, in 100µl Laufmittel der HPLC (Methanol : H₂O = 4,5 : 5,5 + 10% THF) aufgenommen und in die HPLC-Schleife injiziert.

Das Chromatogramm zeigt einen gut detektierten und integrierbaren Testosteronpeak ohne Überlagerung. Die Integration gibt den Testosterongehalt mit 23,9ng an. Nach Extraktion werden 46,6% der eingesetzten 50ng Testosteron wiedergefunden, was einer verbleibenden Testosteronmenge von 23,3ng entspricht.

Das Chromatogramm einer identischen Serumprobe nach alleiniger Sep pak^R-Extraktion weist wesentlich mehr störende Verunreinigungen auf. Bei Elution des Testosteronpeaks ist die Grundlinie nicht erreicht, der Peak kann nicht integriert werden.

Die Kombination der Kieselgur- und C₁₈-reversed-phase-Methoden scheint für die Probenaufbereitung zur HPLC-Analytik am ehesten geeignet.

PROBENAUFBEREITUNG

- 88 -

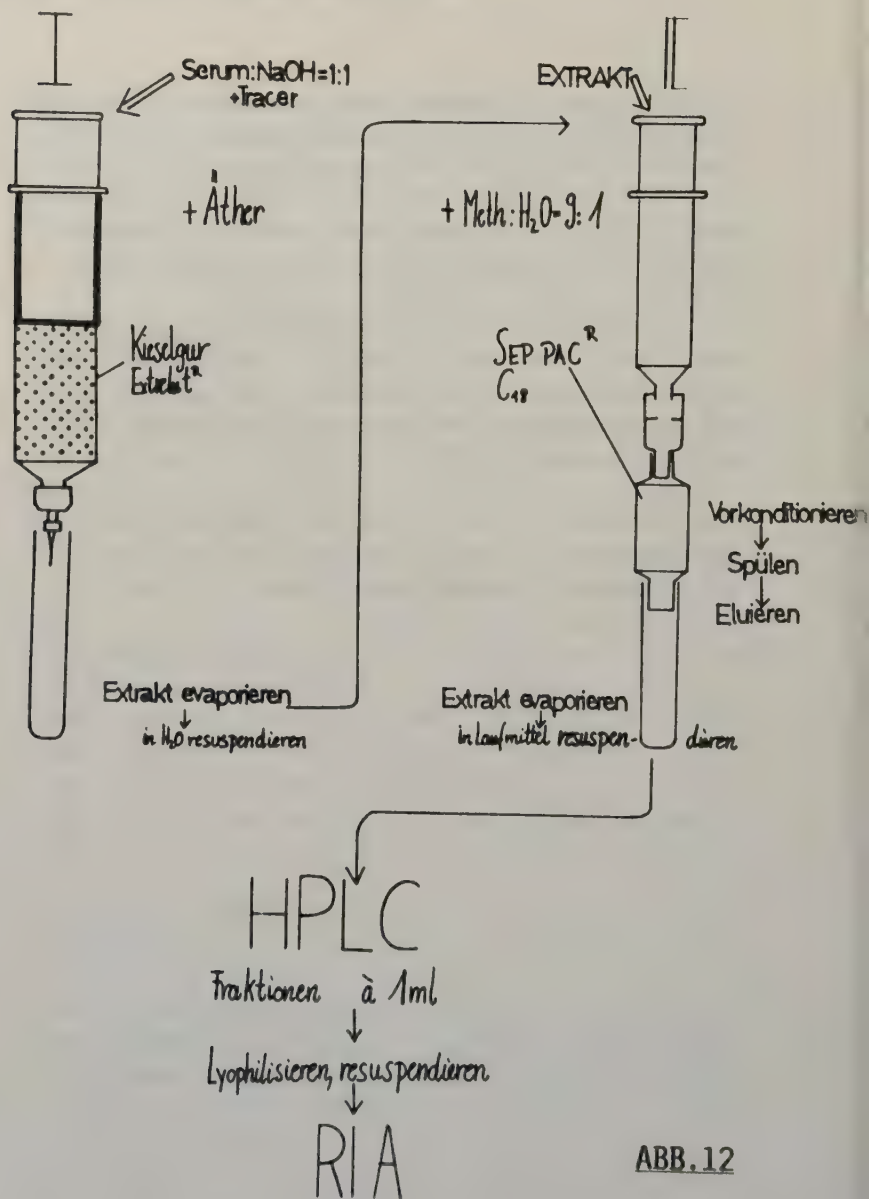


ABB. 12

2.4.5.3. Endgültige Methode

Abb. 12 zeigt den Ablauf des kombinierten Extraktionsverfahrens.

Extraktion im 1. Schritt erfolgt auf Extrelut^R-Kieselgur. Serum mit Tracerzusatz wird zu gleichen Teilen mit 0,1n NaOH verdünnt und aufgetragen. Die Einwirkzeit beträgt 10 - 15 min. Extrahiert wird mit Äther. Das Äthervolumen richtet sich nach Probenvolumen und Größe der Extrelut^R-Säulen. Für Extraktion von bis zu 1ml Probe genügen 6ml Äther, bis zu 3ml Probe 15ml Äther. Extraktion von 20ml Probenvolumen geschieht mit 50ml Äther.

Nach Evaporation wird in H₂O resuspendiert. Es folgt der Sep pak^R-Schritt.

Einstellung auf pH 3 kann, da es sich nun nicht mehr um originäre Serumproben handelt, unterbleiben. Ansonsten wird mit beschriebener Vorkonditionierung, 2 Spülschritten und Extraktion in 1ml unpolarem Methanol-Wasser-Gemisch im Verhältnis 9 : 1 verfahren. (2.4.4.2.) Das Extrakt wird abermals eingedampft, in Laufmittel der HPLC aufgenommen und injiziert. Quantitative Bestimmung durch Integration oder RIA schließt sich an die Hormontrennung an.

Die Wiederfindung nach dem 1. Schritt beträgt 87,7% im Mittel, VK = 7,7%, n = 10.

Alleinige Sep pak^R-Extraktion erzielt eine mittlere Wiederfindung von 81,7%, VK = 6,3%, n = 9.

Kombination beider Schritte führt letztendlich zu einer Gesamtwiederfindung von 66,5%, VK = 7,0%, n = 10.

2.4.5.4. Ergebnisse

Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse der Extraktionsversuche wie folgt formulieren:

1. Die Wiederfindungsraten bei flüssig-flüssig-Extraktion durch Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln (Äther, Dichlormethan, Essigsäureethylester-Hexan-Gemisch) bleiben mit

$$\bar{x} = 46,8\%, \text{VK} = 30,6\%, n = 6$$

ungenügend. Die Reproduzierbarkeit ist nicht befriedigend. Das Verfahren scheidet für die Steroidextraktion zu unseren Zwecken aus.

2. Das flüssig-fest-Verfahren mit Kieselgur (Extrelut^R) führt zu guten Ergebnissen bei einer Wiederfindung von

$$\bar{x} = 87,7\%, \text{VK} = 7,7\%, n = 10.$$

Die optimale Vorverdünnung des Serums ist beim Verhältnis 1 : 1 gegeben. Das pH-Optimum liegt bei pH 8,0-8,5, weshalb die Serumverdünnung mit 0,1n NaOH erfolgt. Als geeignetstes Extraktionsmittel erweist sich im Vergleich Äther.

3. Die Extraktionsmethode mit Sep pak^R-reversed-phase-Kartuschen erzielt mit einer Wiederfindung von

$$\bar{x} = 81,7\%, \text{VK} = 6,25\%, n = 9$$

ebenfalls gute Erfolge. Das pH-Optimum - eingestellt durch Serumverdünnung mit 0,1n HCl - liegt hier bei pH 3. Geeignete Spülschritte können mit 10ml H₂O und 3ml Methanol : H₂O = 1 : 1 durchgeführt werden. Die Extraktion erfolgt mit 2ml Methanol : H₂O = 9 : 1.

Andere Lösungsmittel wie Acetonitril und Tetrahydrofuran sind den Methanolgemischen unterlegen. Bei Variation der zu extrahierenden Volumina von 1ml bis 10ml ist keine signifikante Änderung der Wiederfindungsrate zu verzeichnen (2.4.4.1.6.).

4. Ein einziger Extraktionsschritt erbringt - wie HPLC-Läufe zeigen - keine ausreichende Vorreinigung der Serumextrakte.

Eine Verbesserung der Reinheit - limitiert durch Serumvolumina von > 20ml - ist durch Kombination der Extrelut^R- und der Sep pak^R-Methode zu erzielen. Die Gesamtwiederfindung nach beiden Schritten beträgt im Mittel:

$$\bar{x} = 66,5\%, \text{VK} = 7,0\%, n = 10.$$

2.4.6. HPLC der Serumextrakte

Die Trennung der Hormone aus den Serumextrakten wird - nochmals zusammenfassend - unter zwei Gesichtspunkten vorgenommen:

1. Es soll versucht werden, die Hormone als Einzelpeaks zu detektieren und ihre Konzentration durch Integration der Peakflächen zu bestimmen.
2. Fraktionen einzelner Hormone, durch HPLC-Trennung gewonnen, sollen alternativ im RIA bestimmt werden, unter Ausschluß von Kreuzreaktionen der Antikörper mit anderen Hormonen.

2.4.6.1. Ergebnisse

1. Die Hormonwiederfindung nach Extraktion beträgt durchschnittlich 66,5%.
2. Die Nachweisgrenze der UV-Detektoren reicht günstigenfalls bis an 10ng des betreffenden Hormons.
3. Die höchste Serumkonzentration der interessierenden Hormone weist Testosteron bei Männern auf mit durchschnittlich 5,6ng/ml. (2.3.3.) Geht man von einer zur Bestimmung eingesetzten Serummenge von 10ml aus, so enthält eine Probe in etwa 56ng Testosteron. Nach Extraktion verbleiben ca. 37ng. - Eine noch detektierbare Menge.

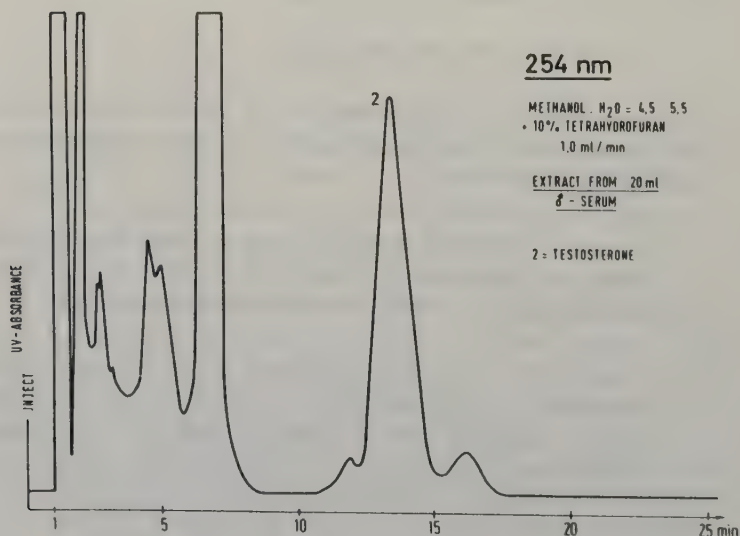


ABB.13 EXTRAKT AUS 20 ml SERUM EINES MANNES

Der Testosteronpeak (2) ist hier von der Front verunreinigender Substanzen abgetrennt und integrierbar.

4. Die Serumkonzentration aller anderen Hormone aber, sowie des Testosterons bei der Frau, sind wesentlich geringer, bei zusätzlich z.T. erheblich schlechterer Nachweisbarkeit. (2.3.2.2.)

Im Falle des Testosterons z.B. müsste zur Hormonbestimmung über Integration bei einer mittleren Serumkonzentration bei der Frau von 0,4ng/ml, unter Berücksichtigung der Verluste durch Extraktion, eine Serummenge von mindestens 50ml eingesetzt werden. Bei den vier anderen Hormonen sind die Verhältnisse ähnlich.

5. Die zur routinemäßigen Hormonbestimmung einzusetzende Serummenge über 10ml hinaus zu steigern, scheidet aufgrund der damit verbundenen Belastung für den Patienten aus.

Hinzu kommt, daß sich trotz aufwendiger Probenaufbereitung bei Extraktion derart großer Serummengen Peaküberlappungen durch hochabsorbierende Störsubstanzen ergeben, die die Integration unmöglich machen.

6. Das Vorhaben der integrativen Hormonbestimmung muß unter diesen Bedingungen aufgegeben werden.

7. Die Konzentrationsmessung im RIA nach HPLC-Trennung wird angestrebt.

Hierfür werden die Extrakte wie folgt aufbereitet:

Das Eluat der HPLC wird in Fraktionen à 1ml gesammelt. Der von Anfang an der Serumprobe zugesetzte Tracer ermöglicht auch jetzt die Lokalisation des im Chromatogramm nicht nachweisbaren Hormonpeaks. Aliquots à 100µl werden dazu den Einzelfraktionen entnommen und ihre Aktivität wird gemessen.

Die hormonhaltigen Fraktionen werden wiederum eingedampft oder lyophilisiert und in Phosphatpuffer von pH 7,4 resuspendiert. Die Bestimmung im RIA schließt sich an.

Die Wiederfindung nach alleinigem HPLC-Lauf wird durch Injektion von tritiiertem Testosteron ohne vorherige Extraktionsschritte gemessen.

In 2ml der Peakfraktionen finden sich

68,9%

68,0% $\bar{x} = 68,5\%$, $n = 2$ der Ausgangsaktivität.

In 3ml peakenthaltendem Eluat beträgt die Wiederfindung:

72,3%

92,6% $\bar{x} = 82,5\%$, $n = 2$.

8. Die Bestimmung der Wiederfindung nach HPLC über alle Schritte, einschließlich der Extraktionen, ergibt:

$$\bar{x} = 54,0\%, \text{VK} = 7,9\%, n = 10$$

2.5. Kombination von HPLC und RIA

2.5.1. Prinzip

Der Radioimmunoassay entstammt der Gruppe der kompetitiven Proteinbindungsassays.

Prinzip ist die Konkurrenz radioaktiv-markierter und unmarkierter Probensubstanz um die Bindung an einen Liganden, in diesem Fall an einen Antikörper. Je mehr unmarkiertes Antigen vorhanden ist, um so weniger Radioaktivität ist in der Fraktion der Ag-Ak-Komplexe nachweisbar. Trennung von freiem und Ak-gebundenem Ag vor Aktivitätsmessung ist Voraussetzung.

Bei Zusatz jeweils konstanter Mengen markierten Antigens und Antikörpers ist jeder Konzentration an unmarkiertem Ag eine ganz bestimmte Anzahl der in der gebundenen Fraktion meßbaren radioaktiven Impulse zuzuordnen.

Anhand einer aus Proben bekannter Ag-Konzentrationen erstellten Eichkurve kann für jede Countzahl die entsprechende Probenkonzentration an Ag abgelesen werden.

Grund für die Dominanz des RIA auf dem Gebiet der Steroidhormonanalytik ist vor allem seine hohe Empfindlichkeit.

So weist er Steroidkonzentrationen noch bis in pg-Bereiche nach, an denen die Sensitivität praktisch aller in der HPLC verwendeten Detektoren scheitert.

Trotz ausgefeilter Methodik der Antikörpergewinnung (61) ist es bei den geringen strukturellen Unterschieden der einzelnen Steroide allerdings schwierig, die Spezifität des RIA hochzuhalten. Kreuzreaktivitäten lassen sich nicht vermeiden.

Dies eben ist der Grund für die kombinierte Anwendung von HPLC und RIA, ein Verfahren wie es für verschiedene andere Steroide bereits beschrieben ist. (15,65)

Am Beispiel des Testosteron wird im folgenden die Verknüpfung beider Methoden getestet.

Alle Proben werden im routinemäßig laufenden Testosteron-RIA mitbestimmt.

2.5.2. Ergebnisse

Das gemessene Kollektiv umfaßt Seren gesunder Männer und Frauen, sowie hirsuter Frauen und hypogonader Männer.

Folgende Testosteronwerte werden bestimmt:

1 - 14 Gesunde Männer	RIA ohne vorherige HPLC-Trennung	RIA nach HPLC
	1. 5,93ng/ml	1. 5,63ng/ml
	2. 7,07 "	2. 5,28 "
	3. 6,32 "	3. 5,89 "
	4. 5,59 "	4. 3,98 "
	5. 6,92 "	5. 3,33 "
	6. 6,95 "	6. 7,18 "
	7. 13,00 "	7. 8,50 "
	8. 9,20 "	8. 7,25 "
	9. 5,87 "	9. 4,05 "
	10. 8,23 "	10. 6,41 "
	11. 8,30 "	11. 8,02 "
	12. 9,61 "	12. 8,45 "
	13. 15,24 "	13. 11,89 "
	14. 7,91 "	14. 6,84 "
	$\bar{x} = 7,9 \pm 3,4\text{ng/ml}$	$\bar{x} = 6,6 \pm 2,2\text{ng/ml}$
	n = 14	n = 14

Normalwert laut Literatur: $\bar{x} = 5,6\text{ng/ml}$ (4,0 - 10,0ng/ml)

15 Gesunde Frau	15. 0,34ng/ml	15. 0,16ng/ml
-----------------------	---------------	---------------

Normalwert laut Literatur: $\bar{x} = 0,4\text{ng/ml}$ (0,2 - 0,8ng/ml)

16 - 24 Hirsute Frauen	RIA ohne vorherige HPLC-Trennung	RIA nach HPLC
	16. 0,93ng/ml 17. 0,64 " 18. 1,27 " 19. 2,16 " 20. 1,40 " 21. 0,86 " 22. 0,43 " 23. 1,30 " 24. 0,64 "	16. 0,86ng/ml 17. 0,75 " 18. 0,75 " 19. 0,74 " 20. 0,97 " 21. 0,26 " 22. 0,45 " 23. 0,88 " 24. 0,63 "
	$\bar{x} = 1,1 \pm 0,5\text{ng/ml}$ n = 9	$\bar{x} = 0,7 \pm 0,2\text{ng/ml}$ n = 9
25 - 26 Hypogonade Männer	25. 2,22ng/ml 26. 2,41 " $\bar{x} = 2,3\text{ng/ml}$, n=2	25. 0,67ng/ml 26. 1,53 " $\bar{x} = 1,1\text{ng/ml}$, n=2
27 - 30 mit Stan- dard ange- reicherte Poolseren	27. Ohne Standard: 2,20ng/ml 28. + 100ng/ml: 111,2 " 29. + 200ng/ml: 248,8 " 30. + 400ng/ml: 426,8 "	

Proben 27 - 30 enthalten im Gegensatz zu den anderen keinen Tritiumzusatz.

Sie demonstrieren die Tendenz des RIA - beruhend auf Kreuzreaktionen -, die Hormonwerte zu hoch zu bestimmen.

Um den Einfluß des Tritiumgehaltes der Serumproben auf den RIA, der auf Markierung mit radioaktivem Jod basiert, festzustellen, sowie eventuell storende Rückstände nach HPLC auszuschließen, werden zwei "Blank-Proben" gemessen:

A) Je 1ml H_2O ohne Tritiumzusatz wird im RIA vor und nach HPLC-Trennung eingesetzt;

Vor HPLC-Trennung wird kein Hormongehalt im RIA festgestellt, nach der Trennung beträgt der "vorge-tauschte" Hormongehalt 0,02ng/ml.

B) Je 1ml H_2O mit Tritiumzusatz führt ohne HPLC-Trennung zu einem scheinbaren Hormongehalt von 0,09ng/ml, nach HPLC von 0,18ng/ml.

Das Mitbestimmen von Blank-Proben in jedem Ansatz, der Tritium enthaltende Seren mißt, erscheint daher ratsam. Die zur Wiederfindungsbestimmung über Extraktionsschritte und HPLC-Lauf eingesetzte Tritiumaktivität ist möglichst niedrig zu halten, um eine radio-lytische Zerstrahlung der Komponenten des RIA zu vermeiden.

Abb. 14 veranschaulicht die Korrelation der RIA-Werte obiger 26 Seren, bestimmt vor und nach HPLC-Trennung. Der Korrelationskoeffizient beträgt $r = 0,97$ ($n=26$). Die Gerade wird beschrieben mit: $y = 0,8x - 0,11$. Die generelle Tendenz des RIA, Hormonwerte ohne vorherige Trennung höher zu messen, geht aus der Steigung der Geraden von 0,8 hervor.

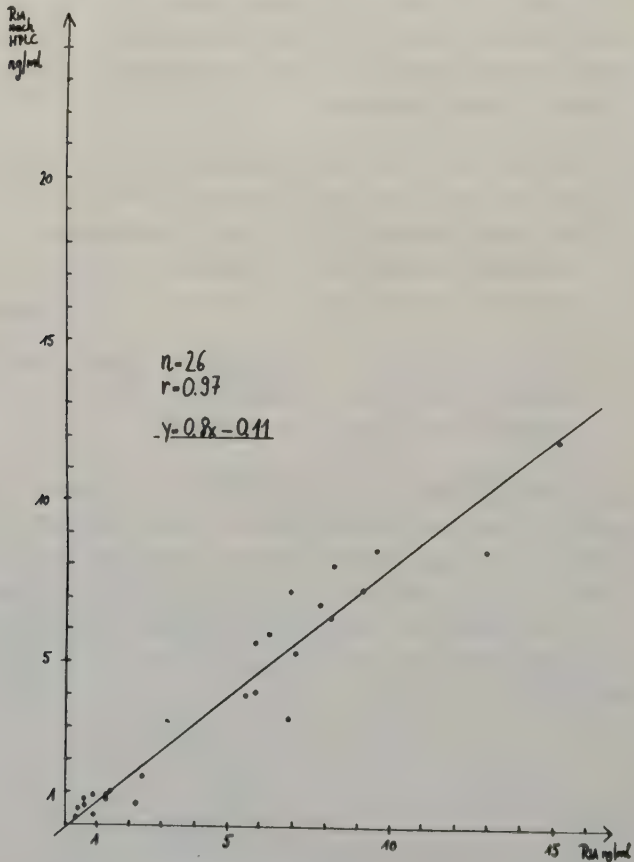


ABB.14 KORRELATION VON TESTOSTERONWERTEN
GEMESSEN IM RIA VOR UND NACH HPLC

2.6. Derivatisierung

Die integrative Bestimmung der Hormonkonzentrationen scheitert an der ungenügenden Sensitivität der UV-Detektion.

Zu deren Steigerung wird heute in der Analytik vielfach der Weg der Derivatisierung beschritten. In diesem Verfahren wird an die Ausgangssubstanz ein leichter nachzuweisender Stoff chemisch gebunden. In der Steroidforschung werden dazu bei bestimmten Wellenlängen stark absorbierende Farbstoffe verwendet.

Derivatisierung von Hormonen mit Isonicotinhydrazin (20) und Dansylhydrazin (7,27,28,70) verlangt Detektion im Fluoreszenzphotometer.

Die von J.F.Lawrence und R.W.Frei (37) angegebene Methode benutzt 2.4.-Dinitrophenylhydrazin (2.4.-DNPH). Dieses absorbiert maximal bei 254nm Wellenlänge und hat damit den Vorteil, UV-photometrisch nachweisbar zu sein.

Dies ist das im folgenden leicht modifiziert eingesetzte Verfahren.

2.6.1. Methode

2.4.-Dinitrophenylhydrazin ist ein in der Chemie zum Nachweis von Aldehyden und Ketonen verwendeter Farbstoff.

Auch die fünf betreffenden Steroidhormone tragen mindestens eine Ketogruppe am A- oder D-Ring.

Androstendion (Δ^4) und 17α -OH-Progesteron (17α -OH-P) besitzen, wie Abb. 15 zeigt, zwei Ketogruppen.

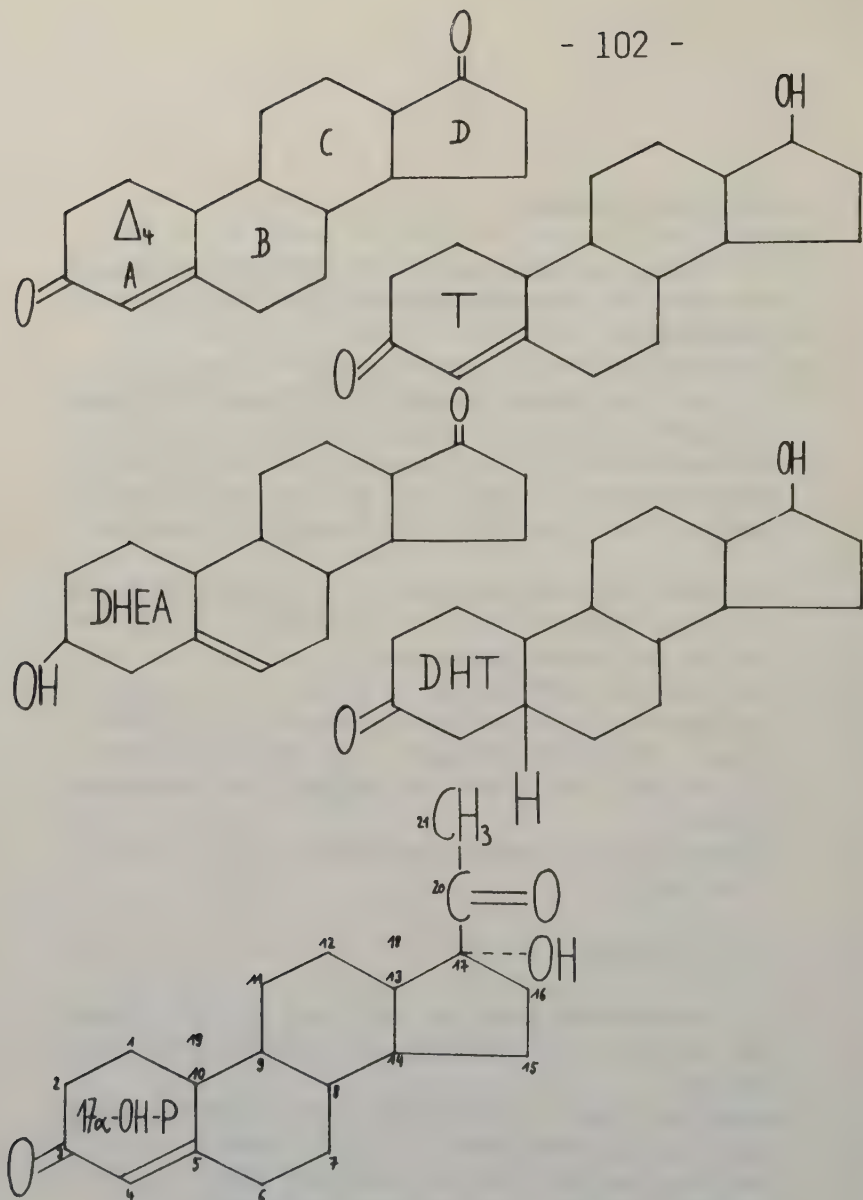


ABB.15 STRUKTURFORMELN VON

Δ_4 , T, DHEA, DHT, 17 α -OH-P

Der Reaktionsmechanismus ist der der nukleophilen Addition.

Das Hydrazin bindet unter Wasserabspaltung an die Ketogruppe des Hormons, es entsteht ein Hydrazon. Abb. 16 veranschaulicht dies.

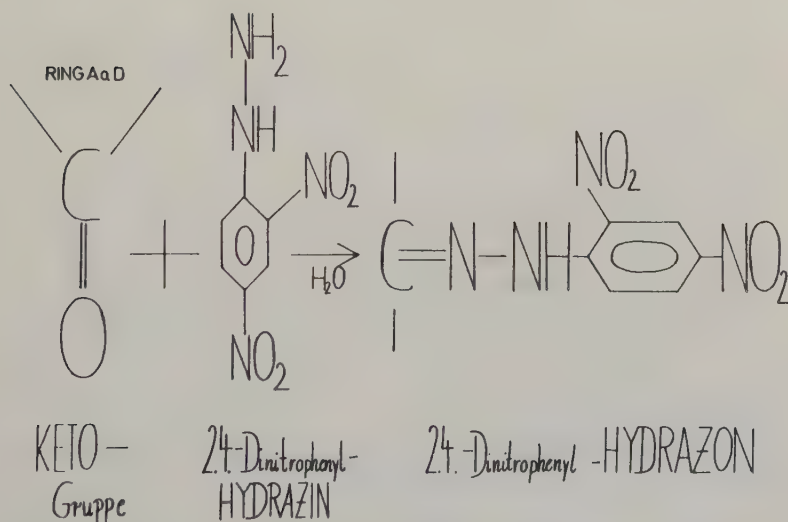


ABB. 16 DERIVATISIERUNG VON KETONEN MIT 2.4.-DNPH
DURCH NUKLEOPHILE ADDITION

Für die Umsetzung werden Steroidstandards bzw. Serum-extrakte in Methanol gelöst.

Das erforderliche saure Milieu wird durch Zusatz konzentrierter Salzsäure (HCl) geschaffen. Für 1ml Hormonlösung ist die Zugabe von 3 Tropfen konzentrierter Salzsäure optimal.

2.4.-Dinitrophenylhydrazin wird als 0,2%ige Lösung in Methanol in molarem Überschuß bezüglich der Anzahl der Ketogruppen beigelegt.

Das optimale Verhältnis zeigt sich bei 6-fach molarem Überschuß, entsprechend der Zugabe von 1 Tropfen ($\approx$ 20 μ l) 0,2%iger 2.4.-DNPH-Lösung zu 1ml einer Hormonlösung der Konzentration 10 μ g/ml. (1mol T=288,4g; 1mol Δ 4=286,4g; 1mol 17 α -OH-P=314,5g; 1mol DHEA=288,4g; 1mol DHT=290,5g; 1mol 2.4.-DNPH=198,1g).

Das Reaktionsgemisch wird über 1 h unter Erwärmung geschüttelt. Variation der Temperatur von 30°C - 70°C zeigt ein Optimum bei 50°C.

Bei Umsatz größerer Hormonmengen im μ g-Bereich beweist ein roter Niederschlag die stattgefundene Reaktion. Dieses Reaktionsprodukt ist gering konzentriert in Methanol, in höheren Konzentrationen in Dioxan löslich.

Sein Absorptionsmaximum liegt bei 254nm Wellenlänge.

2.6.2. Dünnschichtchromatographie des 2.4.- Dinitrophenylhydrazons

Für qualitative Trennung von Substanzen unterschiedlicher Hydrophilie ist die Dünnschichtchromatographie (DC) ein schnelles und bewährtes Verfahren.

Die DC ist eine Abwandlung der Verteilungschromatographie, bei der die stationäre Phase aus an einen festen Träger gebundenem H_2O besteht. Trägersubstanzen sind dünn auf Glasplatten aufgepreßte Kieselgeele, bzw. wie in unserem Fall Aluminiumoxid.

Die mobile Phase ist ein H_2O -gesättigtes Gemisch organischer Lösungsmittel.

Die Trägerplatte steht senkrecht in einer dicht schließenden Glaskammer. Die mobile Phase durchwandert sie von unten nach oben und nimmt dabei die an der Startlinie aufgetragenen Substanzen unterschiedlich weit mit. Der sogenannte R_f -Wert charakterisiert die Wanderungsgeschwindigkeit jeder Substanz.

$$R_f = \frac{\text{Strecke der Substanzwanderung}}{\text{Wanderungsstrecke der Laufmittelfront}}$$

Wir setzen die DC ein, um die Entstehung von Hydrazin-derivaten der Steroide zu beweisen und um zu kontrollieren, ob eine vollständige Umsetzung der Hormone erfolgt.

Mobile Phase ist ein Gemisch von Chloroform : Dioxan = 47 : 3.

Abb. 17 zeigt die Auftrennung des unter Tritium-zusatz (3H) entstandenen 2.4.-Dinitrophenylhydrazons von Testosteron.

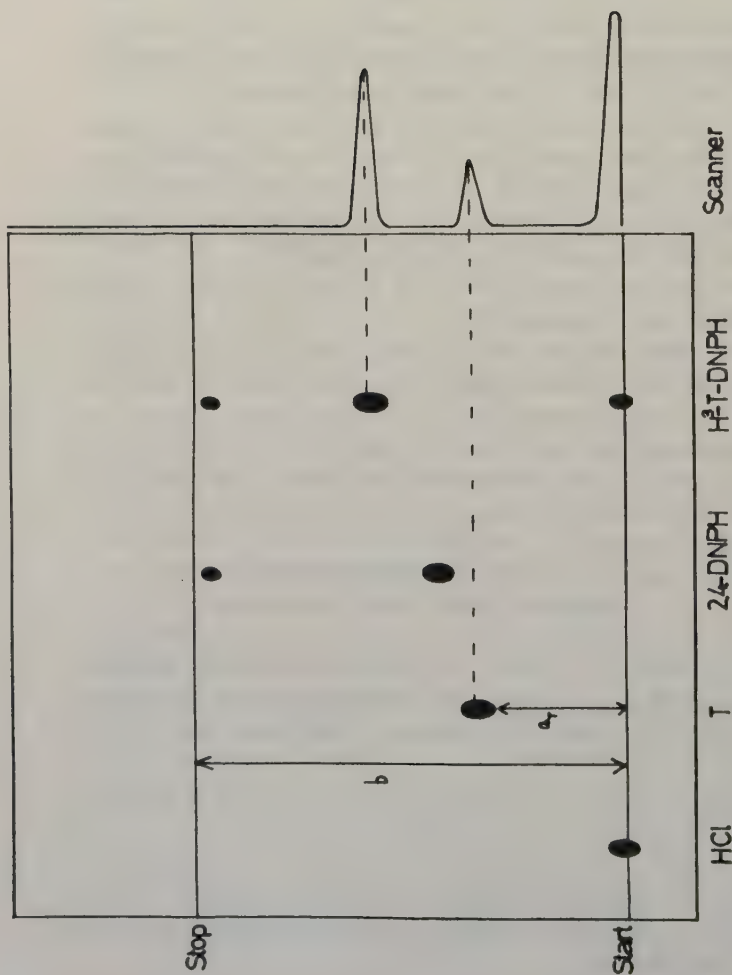


ABB. 17 DÜNN SCHICHTCHROMATOGRAPHIE VON ^3H -TESTOSTERON-2,4,6-DNPH

Die Ausgangsstoffe der Reaktion Testosteron, 2.4.-Dinitrophenylhydrazin und HCl sind zur Identifizierung der Spots mitaufgetragen.

HCl bleibt, wie für sehr polare Substanzen und Salze üblich, an der Startlinie liegen. Testosteron durchläuft die Strecke a_T .

Sein R_f -Wert ist charakterisiert durch $R_f = \frac{a_T}{b}$.

2.4.-DNPH weist eigenartigerweise regelmäßig zwei Spots auf, von denen sich einer bei der Auftrennung des Produktes ^3H -Testosteron-Dinitrophenylhydrazon (^3H -T-DNPH) wiederfindet. Er zeigt den 2.4.-DNPH-Überschuß bei der Umsetzung an.

Die Identifikation der Spots geschieht aufgrund ihres Absorptionsverhaltens unter der UV-Lampe bei 254nm Wellenlänge.

Im Anschluß an die Trennung wird die Verteilung der Tritiumaktivität mit dem Scanner überprüft:

Bei nicht vorgereinigtem Tracer bleibt relativ viel Tritium am Start liegen. Ein zweiter Aktivitätspeak findet sich an der Stelle des Testosteronsports. Er zeigt, daß Testosteron nicht vollständig umgesetzt wurde; ein Faktum, an dem sich trotz zahlreicher Versuche, die Derivatisierung zu optimieren, nichts ändert.

Der dritte Scannerpeak markiert den neu entstandenen Spot:

Es handelt sich um das Produkt der Reaktion, das 2.4.-Dinitrophenylhydrazon des Testosteron.

2.6.3. Präparative Dünnschichtchromatographie

Das Verhalten der Hormonderivate in der HPLC-Trennung ist zunächst unbekannt.

HPLC mit üblichem Laufmittel zeigt deutlichen 2.4.-DNPH-Überschuß und Peaks der nicht völlig umgesetzten Hormone.

Die Produkte der Reaktion sind anfangs nicht detektierbar.

Die Anwendung der sogenannten präparativen Dünnschichtchromatographie ermöglicht die Isolierung der Produkte in Reinform und ihre Identifikation mit HPLC.

Zur präparativen Trennung wird der in Dioxan gelöste, unter ^3H -Zusatz entstandene Niederschlag der Derivatisierung nicht nur in Spotform, sondern auf wesentlich dickere Platten strichförmig in mehreren Schichten über die ganze Plattenbreite aufgetragen.

Trennung vom 2.4.-DNPH-Überschuß und nicht umgesetztem Hormon erfolgt analog der üblichen DC.

Scanner und Referenzläufe auf nicht-präparativen Platten erlauben die Identifikation der Produktzone. Sie wird herausgekratzt. Waschschritte mit Essigsäure-ethylester und Dioxan lösen das Produkt vom Träger. Das Extrakt wird im Rotationsverdampfer eingengt, in Methanol gelöst und in die HPLC-Schleife injiziert.

Abb. 18 zeigt die präparative DC von ^3H -DHEA-DNPH.

Die breite Bande in Plattenmitte ist Produktzone. Sie ist im Original tiefgelb. Am linken Rand findet sich die Aktivitätsaufzeichnung des Scannerlaufs. Eine leichte Überladung der Platte führt zur Verschleppung von Tritiumspuren bis zur Laufmittelfront.

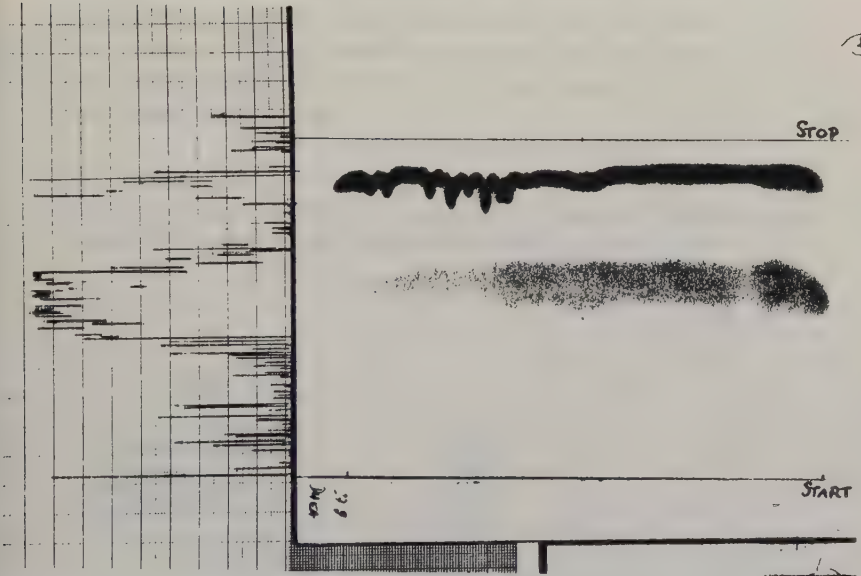


ABB.18 PRÄPARATIVE DC VON ^3H -DHEA-2.4.-DNPH

2.6.4. Ergebnisse

Nach Isolierung der Hydrazone in der präparativen DC gelingt ihre Detektion mit HPLC.

1. Die Retentionszeiten der Derivate haben sich auf ca. das Vierfache verlängert. Die Umsetzung führt somit zu wesentlich hydrophoberen Substanzen, wahrscheinlich bedingt durch die Einführung der Seitenkette.
2. Um dennoch für die Trennung der derivatisierten Hormone passable Retentionszeiten zu gewährleisten, ist die Verwendung eines wesentlich stärker eluierenden Lösungsmittelgemisches nötig.

Nach Austestung verschiedenster Gemische zeigt sich Acetonitril : H₂O = 6 : 4 + 10% THF bei Verwendung der C₈-Säule als das geeignetste.

Die Retentionszeit unbehandelten Testosterons im reversed-phase-Verfahren ist damit 2,5 min, die des Testosteron-2.4.-Dinitrophenylhydrazons 10,0 min.

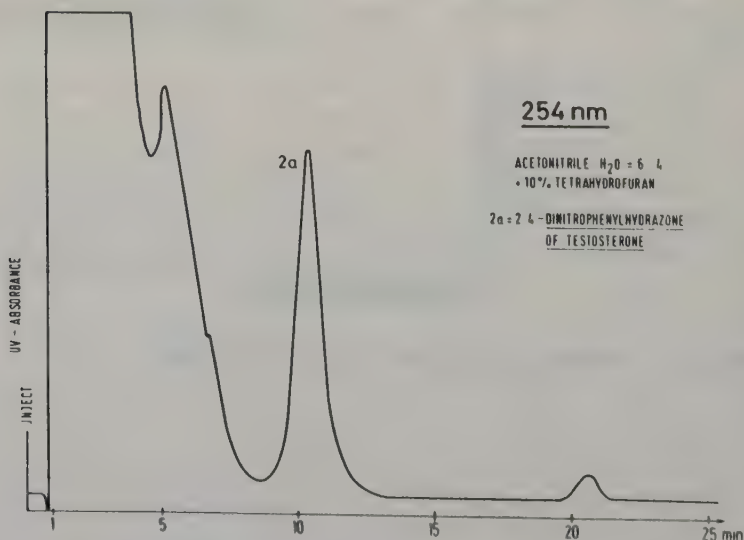


ABB. 19 HPLC VON TESTOSTERON-2.4.-DNPH

Abb.19 zeigt den HPLC-Lauf des Testosteronderivates (2.4.-Dinitrophenylhydrazon von Testosteron).

3. Die breite Peakfront zu Beginn entspricht dem 2.4.-DNPH-Überschuß, sowie nicht derivatisiertem Testosteron.

Diese mangelhafte quantitative Umsetzung der Hormone ist vermutlich der Grund für die ausbleibende Verbesserung der Steroidnachweisbarkeit über den Faktor 2 hinaus.

Sowohl durch Radioaktivitätsmessung der unter ^3H -Zugabe entstandenen Derivate, als auch durch deren Gewichtsbestimmung nach Trocknung, sowie durch Messung im RIA, zeigt sich unvollständige Derivatisierung.

4. Die damit zu erzielende Nachweissteigerung um ca. das Doppelte genügt nicht für die integrative Bestimmung simultan zur HPLC-Trennung.

3. DISKUSSION

3.1. Trennverfahren

Die zunächst erprobte Trennung von $\Delta 4$, DHEA, T und DHT mit herkömmlicher Säulenchromatographie auf Sephadex LH-20-Säulen wurde im wesentlichen nach den von Sippell, Bidlingmaier und Knorr (57,58), sowie von Bassett (4) beschriebenen Verfahren durchgeführt.

Ihr Vorteil liegt in der Möglichkeit, eine große Anzahl von Proben simultan auf parallel betriebenen Säulen zu verarbeiten. Die benötigten Materialien sind preisgünstig und über mehrere Monate verwendbar. Die Reproduzierbarkeit ist bei Peakverschiebungen von $\pm 500 \mu\text{l}$ gut.

In Anwendung auf unsere Fragestellung führt die Methode bei Einsatz eines einzigen Säulen- und Laufmittel-Systems jedoch zur nicht vollständig überschneidungsfreien Trennung der betreffenden Androgene. Hauptnachteil des Verfahrens sind die langsamen, zeitaufwendigen Flußraten (Trennzeit ca. 6h). Die Wiederfindung liegt in der Hälfte der Fälle unter 60%. Das Gießen der Säulen ist mit einer hohen Ausfallsrate verbunden.

Insgesamt erscheint somit dieses Verfahren als für unsere Zwecke wenig effizient.

Die entwickelte HPLC-Trennmethode ermöglicht eine vollständige Trennung der fünf strukturell sehr ähnlichen Steroidhormone in einem einzigsten HPLC-Lauf. Die Trennung ist in weniger als 30 Min. vollzogen. Die Reproduzierbarkeit ist bei einem maximalen Variationskoeffizienten von 5,2% (n=8) sehr gut.

Das Verfahren ist automatisierbar, so daß ohne Assistenz im Über-Nacht-Betrieb gearbeitet werden könnte. Der Nachteil, daß jeweils nur eine einzige Probe in der entsprechenden Trennzeit behandelt und nicht in parallelen Laufsystemen gearbeitet werden kann, tritt damit in den Hintergrund.

Im Vergleich zu herkömmlichen säulen- oder dünn-schicht-chromatographischen Methoden ist die HPLC apparativ aufwendig, teuer und von störanfälliger, komplizierter Technik.

Ist ein bestimmtes HPLC-Trennverfahren jedoch etabliert, so verringern sich die technischen Probleme dabei wesentlich. Durch Automatisierung ist der Aufwand im Routinebetrieb vergleichsweise sogar gering.

Die relativ hohen Anschaffungskosten werden rentabel durch die Anwendbarkeit der HPLC auf unterschiedlichste analytische Probleme und die dadurch zumeist gegebene hohe Auslastung.

Im Vergleich zur Literatur - wobei speziell Androgene bislang in der HPLC-Analytik wenig Interesse fanden - liegt die Besonderheit unserer Steroidtrennung darin, daß sie in einem einzigen Lauf ohne Peaküberlappungen und ohne einen Laufmittelgradienten zu bedürfen gelingt. Mit Gradientensystemen erzielten zum Beispiel Schöneshöfer und Dulce 1979 (65) die Trennung von 19 Steroidhormonen - darunter die von uns untersuchten fünf - in ca. 40 Min. Auch O'Hare, Nice, Magee-Brown und Bullman arbeiteten 1976 (46) mit Gradienten-elutionen. Kessler gelang 1982 (31) die Separation unter anderem auch von 17α -OH-P, $\Delta 4$, DHEA, T und DHT ebenfalls durch Einsatz von Laufmittelgradienten

und durch einen zweiten, nachgeschalteten Trennlauf.

Wir haben bewußt vom Gradientenbetrieb Abstand genommen, um - abgesehen vom größeren apparativen Aufwand - Basislinienverschiebungen, die die Integration von vornherein unmöglich gemacht hätte, zu vermeiden.

Der Grund, warum wir dennoch unser Trennziel erreichten, liegt in der Verwendung eines Dreifach-Gemisches, wie es Lee, Carlson und Kushinsky 1981 (38) empfohlen haben.

Sie beobachteten, daß sich durch Zugabe prozentual geringer Mengen verschiedener Äther (in unserem Fall 10% Tetrahydrofuran) die Selektivität der Trennung von in binären Gemischen koelutierenden Substanzen deutlich verbessern läßt.

3.2. Integration

Die Kombination der HPLC-Trennung mit der simultanen Hormonkonzentrationsbestimmung durch Peakflächenberechnung mittels eines Integrators in einem einzigen Arbeitsgang, wäre eine äußerst effektive und mit 30 min Arbeitszeit pro Probe sehr schnelle Methode. Das Verfahren bietet über ein programmierbares Steuermodul ebenfalls die Möglichkeit der Automatisierung. Der Zusatz radioaktiver Tracer könnte bis auf die Wiederfindung überprüfende Stichproben weitgehend vermieden werden. Die Berechnung der Probenkonzentration anhand der gespeicherten Peakdaten und des Elutionsprofils ist mit einer maximalen Abweichung von $\pm 1,73\%$ sehr genau und gut reduzierbar.

Im Gegensatz zum RIA, wo die abzulesenden Konzentrationen die von der Eichkurve abhängige obere Nachweisgrenze nicht überschreiten dürfen, ermöglicht die Integration die Berechnung auch sehr hoher, die Eichkonzentration um ein Vielfaches übersteigender Probenkonzentrationen.

Messung über Integration ist eine zu erwägende Möglichkeit bei Substanzen, die die zur Antigendeterminierung nötigen Kopplungsverfahren nicht überdauern und damit im RIA nicht zu bestimmen sind.

Dies die Vorteile der Integration.

Dem RIA unterlegen ist sie sicherlich, was dessen niedrige Kosten, seine hohe Kapazität an parallel zu bestimmenden Proben und die ausgefeilte, auf langjährigen, klinischen Erfahrungen beruhende Technik anbelangt.

Der Hauptnachteil des Verfahrens und das Limit seiner Anwendbarkeit aber liegt in der ungenügenden, vom RIA weit übertroffenen, Sensitivität.

Dies ist zum einen begründet in den sehr niedrigen Serumkonzentrationen der zu untersuchenden Substanzen (maximal 10ng/ml), in der ungenügenden Nachweisempfindlichkeit der auf dem Markt befindlichen Detektoren (UV-Detektor bei 254nm Wellenlänge bis maximal 10ng), zum anderen in den nicht zu vermeidenden Wiederfindungsverlusten bei der Probenaufbereitung (Wiederfindung nach zwei Extraktionsschritten und HPLC: 54,0%).

Es ist nicht möglich, die ungenügende Sensitivität durch den Einsatz größerer Serummengen (von über 20ml) zu kompensieren, da sich dann in zunehmendem Maße Peaküberlagerungen durch extraktiv nicht zu beseitigende Störsubstanzen einstellen, ganz abgesehen von der für den Patienten damit verbundenen Belastung.

In der Literatur liegen keine die integrative Bestimmung von 17α -OH-P, $\Delta 4$, DHEA, T und DHT behandelnden Versuche vor.

Die Konzentrationen anderer Steroide konnten zum Teil nach Derivatisierung über Integration gemessen werden (Siehe 3.5.).

Direkte Messung ohne Derivatisierung gelang 1981 Mayer, Schmidt-Gayk e.a. bei der Bestimmung der Serumkonzentrationen von 25-OH-Vitamin-D, mit einem Serumspegel von ca. 25ng/ml und einem Absorptionsmaximum bei 254nm.

In der Bestimmung leicht oxidierbarer Substanzen, wie zum Beispiel der Katecholamine und bestimmter Pharmaka, ist die Anwendung des elektrochemischen Detektors mit hoher Sensitivität und damit ebenfalls die Integration ohne Derivatisierung möglich.

Für adrenale und gonadale Steroide gilt ansonsten auch heute noch, was Schöneshöfer und Dulce bereits 1979 feststellten (65, in Übersetzung):

"Aufgrund ihrer niedrigen physiologischen Konzentrationen und der starken Überlagerungseffekte durch unspezifische, absorbierende Serumkomponenten... werden... Steroide von biologischem Interesse kaum mit HPLC alleine zu messen sein."

(Denkbare Ausnahmen: Cortisol im Serum <Konz. 25ng/ml - 1000ng/ml> und Östriol im Urin).

3.3. Extraktion

Die klassische flüssig-flüssig Extraktion durch Ausschütteln in organischen Laufmitteln bietet die Vorteile, billig, einfach und ohne großen apparativen Aufwand durchführbar zu sein. Es lassen sich viele Proben, je nach Kapazität des verwendeten Schüttlers, gleichzeitig bearbeiten.

Die nach Phasentrennung durch Gefrieren gewonnenen Extrakte haben relativ kleines Volumen und lassen sich rasch evaporieren.

Die Wiederfindung nach einem einzigen Extraktionsgang liegt maximal bei 59,5%. Zu ihrer Steigerung ist die mehrfache Wiederholung der Extraktion notwendig, mit einem erheblichen Zeitaufwand von je 30 min pro Extraktionsvorgang. Die Reproduzierbarkeit ist mit einem Variationskoeffizienten von 30,6%, $n=6$ unbefriedigend.

Insgesamt eignet sich daher dieses Verfahren für unsere Zwecke nicht.

Auch Wehner und Handke (74) verwerfen es und nennen als Ursache der mangelnden Wiederfindung und der ungenügenden Reproduzierbarkeit die Bildung von Emulsionen aus Probe und organischem Lösungsmittel. Hauptvorteil der flüssig-fest Extraktion auf Kieselgur (Extrelut^R) ist die sehr gut erzielte Wiederfindung von im Mittel 87,7%.

Die in der Literatur beschriebenen Wiederfindungsraten liegen ebenfalls bei 86,8% - 99,3% (64,65,74).

Die Reproduzierbarkeit ist mit $VK = 7,7\%$, $n = 10$ ebenfalls zufriedenstellend.

Der Zeitaufwand pro Extraktionsvorgang ist mit ca. 45 min relativ groß, wobei mehrere Säulen gleichzeitig parallel bearbeitet werden können.

Ein Nachteil der Methode ist die Verwendung des explosiven Lösungsmittels Diäthyläther. Entsprechende Vorsichtsmaßnahmen müssen daher eingehalten werden. Für die Evaporation der relativ großen Extraktionsvolumina von bis zu 50ml werden trotz der guten Flüchtigkeit des Äthers ca. weitere 60 min benötigt. Die HPLC-Trennung der Extrakte zeigt schließlich eine nicht ausreichende, in Peaküberlappungen resultierende Reinigung von Störsubstanzen, wie sie auch Schöneshöfer und Dulce (65) beobachteten. Während sie die Möglichkeit der Peakintegration daher bereits an dieser Stelle verwerfen, versuchen wir durch Kombination der Methode mit dem Sep pak^R-Verfahren die dafür notwendigen Voraussetzungen zu schaffen. Die Sep pak^R-Extraktion auf kleinen reversed-phase Kartuschen erfreut sich zunehmender Beliebtheit (2,52,54,55). Der Grund liegt in der einfachen Handhabung und der schnellen Durchführbarkeit der Extraktion (ca. 5 min pro Probe), sowie in der guten Wiederfindung von 81,7%, n=9, bei guter Reproduzierbarkeit (VK = 6,25%).

Sie übertrifft die ebenfalls häufig angewandte Extrelut^R-Methode an Einfachheit und Schnelligkeit bei etwas niedrigerer Wiederfindung. Ein weiterer Vorteil besteht in der Extraktanreicherung in geringen Volumina von 1-2ml. Ungünstig ist, daß die Probenextraktion vollständig manuell durchgeführt werden muß, wobei nur eine Probe nach der anderen behandelt werden kann. Erste Versuche zur Automatisierung

durch Anlegen eines Soges wurden von Seiten des Herstellers bereits unternommen.

Die durch Sep pak^R-Extraktion gewonnenen Proben lassen in der HPLC ebenfalls die geforderte Reinheit vermissen. Auch Ramirez e.a. (52) weisen bei Anwendung der gleichen Methode auf die Schwierigkeit der integrativen Bestimmung biologischer Proben von geringer Konzentration hin, da diese zumeist zusammen mit einem großen Überschuß störenden Materials vorkommen. Sie können verschiedene endogene und exogene Steroide bis zu einer Nachweisgrenze von 50-100ng durch Integration bestimmen (Eigene Nachweisgrenze: 10ng).

Die kombinierte Anwendung des Extrelut^R- und Sep pak^R-Verfahrens führt letztlich trotz erheblichem präparativen Mehraufwand zu einer nur geringfügigen Verbesserung der Probenreinheit. Die eingesetzte Serummenge darf auch hier nur maximal 20ml betragen. Diese Menge genügt nicht, um bei einer Gesamtwiederfindungsrate von 66,5% und Serumkonzentrationen von unter 10ng die Nachweisgrenze der UV-Detektion zu überschreiten. Lediglich Testosteron aus dem Serum gesunder Männer kann unter diesen Bedingungen integrativ bestimmt werden. Das Ziel der Konzentrationsmessung durch HPLC und Integration muß daher aufgegeben werden.

3.4. HPLC und RIA

Auf dem heutigen technischen Stand bleibt der RIA somit unumstritten Methode der Wahl in der quantitativen Hormonanalyse.

Wie Schöneshöfer, Jaster und Fenner (64), so halten auch wir nach den gemachten Erfahrungen die Kombination von HPLC und RIA trotz großem zeitlichem und apparativem Aufwand für die derzeit geeignetste Methode der exakten Bestimmung mehrerer Steroide aus einer Serumprobe. Dies wird relevant, wenn aufgrund der klinischen Fragestellung die Relation der Hormonkonzentrationen zueinander eine Rolle spielt und Kreuzreaktionen der Steroid-AK mit dem jeweils anderen Steroid zu erwarten sind.

Für Routinebestimmungen einzelner Hormone hingegen sind auf Kreuzreaktionen beruhende, im RIA alleine zu hoch gemessene Werte - an ebenfalls höher bestimmten Normalwerten orientiert - nicht problematisch.

Die Korrelation der RIA-Werte vor und nach HPLC ist mit $r = 0,97$, $n = 26$ hervorragend. Die Tendenz des RIA, die Werte generell zu hoch zu messen, findet in der Steigung $= 0,8$ der Geraden $y = 0,8x - 0,11$ ihren Ausdruck.

3.5. Derivatisierung

Bei einigen biologischen Substanzen, deren Serum- oder Urinkonzentrationen im unteren ng-Bereich liegen, gelingt die integrative Konzentrationsmessung simultan zur HPLC durch einen der Trennung vor- oder nachgeschalteten Derivatisierungsschritt.

Hierbei werden an die zu messenden Substanzen leichter zu detektierende Stoffe, meist Farbstoffe oder fluoreszierende Agentien, chemisch gekoppelt.

Mehrfach angewandt werden in der Hormonanalytik bislang Umsetzungen mit Dansylhydrazin und Isonicotinylhydrazin.

Während hierbei Toothaker e.a. (70) bei der Messung von Plasmacortisolspiegeln und Horikawa (20) bei der Messung von Cortisol, Corticosteron, Desoxycorticosteron, Androstendion und Progesteron im Vergleich zur bloßen UV-Detektion keine Verbesserung der Nachweisgrenze sehen, gelingt Kawasaki e.a. (27,28) die Bestimmung von 17-OH-Corticosteroiden im Urin und von mehreren Steroiden im Serum nach Derivatisierung mit Dansylhydrazin in Konzentrationsbereichen von 60pg bis 20ng. Auch Burman e.a. (7) zeigen 1981 eine Alternative zur Thyroxinbestimmung im RIA durch HPLC-Messung nach Umsetzung mit Dansylhydrazin.

Dansyl- und Isonicotinyl-hydrazin-derivate erfordern den Einsatz von Fluoreszenzdetektoren.

Demgegenüber hat die von Lawrence und Frei (37) angegebene Methode der Derivatisierung mit 2.4.-Dinitrophenylhydrazin den Vorteil, daß das Absorptionsmaximum der resultierenden Derivate im UV-Bereich bei 254nm liegt und diese somit mit dem von uns

üblicherweise eingesetzten UV-Detektor gemessen werden können. Die Nachweisgrenze vieler Steroide kann hiermit nach Angaben der Autoren auf bis zu 1 ng herabgesetzt werden.

Das beschriebene, von uns übernommene Verfahren (2.6.1.), hat außerdem den Vorteil, einfach und mit einem Zeitaufwand von ca. 1 Stunde relativ schnell durchführbar zu sein.

Die Derivatisierung der Hormone erfolgt in unserem Fall vor der Trennung ("pre-column-reaction"). Dies hat den Nachteil, daß bei durch die Umsetzung verändertem chromatographischem Verhalten der Steroide ein neues Trennverfahren für die Derivate entwickelt werden muß (Laufmittel: Acetonitril : H₂O = 6 : 4 + 10% THF, C₈-Säule) und die Isolierung der einzelnen Hormonderivate erst nach zusätzlicher dünn-schicht-chromatographischer Trennung erstmals gelingt.

Die Möglichkeit der Derivatisierung nach der Chromatographie ("post-column-reactio") hingegen würde für die Konzentrationsmessung eines jeden Hormons einen zweiten HPLC-Lauf erfordern, bzw. bei Einfügen einer Reaktionskammer in das HPLC-System zwischen Säule und Detektor, einen ungleich größeren technischen Aufwand bedeuten.

Die Derivatisierung der fünf Steroide mit 2.4.-Dinitrophenylhydrazin wird vielfachen Versuchen der Optimierung von pH, Konzentrationsverhältnissen, Temperatur und Reaktionszeit unterzogen. Dennoch gelingt es nicht, eine vollständige Umsetzung zu erzielen, wie Dünnschichtchromatographie und HPLC-Läufe beweisen. Dies ist der Grund, warum die von uns erreichte Steigerung der Nachweisgrenze um maximal den Faktor 2, hinter der in der Literatur für möglich erachteten Verbesserung (37) zurückbleibt.

An dieser Stelle beschließen wir unsere Versuche der integrativen Hormonbestimmung und bleiben bei der Kombination von HPLC und RIA.

Eine etwaige Sensitivitätsverbesserung durch Hormonderivatisierung mit Dansyl- oder Isonicotinylhydrazin und Messung mit Fluoreszenzdetektoren ist letztlich jedoch nicht auszuschließen.

Die Arbeit von Kawasaki e.a. (27) mag ein erster Wegweiser in diese Richtung sein (Messung mehrerer Steroide nach Derivatisierung mit Dansylhydrazin in Bereichen von bis zu 60pg).

Inwieweit technische Verbesserungen der Detektoren Fortschritte auf dem Gebiet der Hormonanalytik ermöglichen werden, wird die Zukunft zeigen.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Zielsetzung dieser Arbeit war die Entwicklung eines methodischen Verfahrens zur Messung der Serumhormonspiegel folgender fünf Steroidhormone:

- 17α -OH-P (17α -OH-Progesteron)
- DHEA (Dehydroepiandrosteron)
- $\Delta 4$ (Androstendion)
- T (Testosteron) und
- DHT (Dihydrotestosteron).

Ihre strukturelle Ähnlichkeit läßt die spezifische Messung im bislang allein eingesetzten RIA aufgrund von Kreuzreaktionen des jeweiligen AK mit den vier anderen Hormonen schwierig werden.

Die klinische Relevanz dieser Fragestellung besteht unter anderem z.B. in der ätiologischen Zuordnung des Symptomenkomplexes Hirsutismus, der sowohl idiopathischer, als auch adrenaler (z.B. AGS, Cushing-Syndrom) oder ovarieller Genese (Arrhenoblastome, PCO-Syndrom) sein kann, desweiteren im Nachweis einer Androgenproduktion durch Tumore der NNR oder des Ovars, sowie in der Verlaufskontrolle nach deren Therapie.

Der erste Schritt zur Bewältigung der Problematik ist die Entwicklung eines Verfahrens zur Trennung der fünf Hormone, wobei zwei alternative Methoden erprobt werden:

1. Die Säulenchromatographie auf Sephadex LH 20-Säulen führt in einer Zeitdauer von ca. 6 h bei einem Elutionsvolumen von bis zu 18,5ml zur nicht völlig überschneidungsfreien Trennung der Hormone. Getestete Laufmittelgemische sind Cyclohexan : Chloroform : Methanol = 8 : 1 : 1 und n-Heptan : Chloroform : Methanol = 85 : 5 : 5. Die Reproduzierbarkeit

ist bei Peakverschiebungen von $\pm 500\mu\text{l}$ gut. Die Wiederfindungsrate beträgt maximal 65%.

2. Mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie gelingt die Trennung aller fünf Hormone mit dem Laufmittelgemisch Methanol : H_2O = 4,5 : 5,5 + 10% Tetrahydrofuran überschneidungsfrei in ca. 25 min auf der mit Octylsilanmaterial von $10\mu\text{m}$ Durchmesser gefüllten sogenannten C_8 -Kartusche mit 5mm Innendiameter, die unter radialer Kompression in einer speziellen Kammer betrieben wird. Die Detektion erfolgt bei 214nm Wellenlänge im UV-Bereich. Die Reproduzierbarkeit der Trennung ist mit Variationskoeffizienten von maximal 5,2%, $n=8$ zuverlässig.

Die Möglichkeit der Hormonkonzentrationsbestimmung durch Kombination dieser HPLC-Trennung mit einer simultanen Peakflächenintegration wird im Anschluß überprüft.

Kopplung des Chromatographen an einen programmierbaren Rechner und HPLC-Trennung der Steroide in fünf deutlich getrennte Peaks, deren Flächen sich proportional zur Probenkonzentration verhalten, sollten über einen Proportionalitätsfaktor die direkte Berechnung der Substanzkonzentrationen ermöglichen.

Die Berechnung geschieht nach dem sogenannten "Externen-Standard"-Verfahren, wobei die Eichung des Systems durch eine dem Probenlauf vorgeschaltete Chromatographie eines Standards bekannter Konzentration erfolgt (2.3.1.5.1c).

Die Berechnung führt zu sehr genauen Ergebnissen; die maximal beobachtete Abweichung vom tatsächlichen Probengehalt beträgt $\pm 1,73\%$.

Die Nachweisgrenzen jedoch liegen für 17α -OH-P, 44 und T bei 10ng (Messung bei 254nm), für DHEA bei ca. 200ng (Messung bei 214nm) und für DHT bei ca. 300ng (Messung bei 214nm).

Diese im Vergleich zum RIA hohen Nachweisgrenzen limitieren die Anwendung dieses Meßverfahrens bei den Serumkonzentrationen der interessierenden Hormone von maximal 5,6ng/ml (Testosteron bei Männern).

Die Entwicklung eines hochselektiven Extraktionsverfahrens mit möglichst hoher Wiederfindungsrate ist unter diesem Gesichtspunkt essentiell.

Nach Testung dreier verschiedener Methoden erweist sich folgendes, größtmöglicher Reinheit zuliebe, zwei Methoden kombinierendes Verfahren als am geeignetsten:

1.Schritt ist die flüssig-fest Extraktion auf Kieselgur (Extrelut^R)-Säulen. Hierbei wird das Serum mit 0,1n NaOH 1:1 verdünnt und damit auf den für die Methode optimalen pH-Wert von 8,0-8,5 eingestellt. Nach 10-15 minütigem Einwirken der Probe auf der Säule wird mit Äther extrahiert. Das Extrakt wird eingedampft, in H₂O resuspendiert und im 2.Schritt mit Sep pak^R-reversed-phase-Kartuschen aufbereitet. Vorkonditionierung der Kartuschen vor Probenauftrag geschieht mit 5ml Methanol und 10ml H₂O. Nach Probenauftrag folgen zwei Spülschritte mit 10ml H₂O und 3ml Methanol : H₂O = 1 : 1. Extrahiert wird in 1ml Methanol : H₂O = 9 : 1. Nach erneuter Evaporation wird im Laufmittel der HPLC resuspendiert und die chromatographische Trennung angeschlossen.

Die Wiederfindung beträgt nach dem 1.Extraktions-schritt 87,7%, VK = 7,7%, n = 10. Der 2.Schritt erzielt eine Wiederfindung von 81,7%, VK = 6,3%, n = 9. Kombination beider Verfahren erbringt eine Gesamtwiederfindung von 66,5%, VK = 7,0%, n = 10.

Berücksichtigt man Serumkonzentrationen und Nachweisgrenzen der fünf Steroide bei UV-Detektion im HPLC-Lauf, sowie die Wiederfindungsrate von 66,5% nach Extraktion, so ergibt sich eine zur Peakerkennung und integrativen Messung aller fünf Steroide nötige Serummenge von über 50ml.

Die Integration als Methode der Hormonkonzentrationsbestimmung scheidet unter diesen Bedingungen aus.

Möglich ist jedoch jetzt die selektive Messung im RIA nach HPLC-Trennung durch dadurch gewährleisteten Ausschluß von Kreuzreaktionen.

Die Wiederfindung nach HPLC über alle Schritte beträgt 54,0%, VK = 7,9%, n = 10.

Nach Evaporation der hormonhaltigen HPLC-Fractionen und Resuspension im Phosphatpuffer von pH 7,4 schließt sich der RIA an.

Die von uns auf diesem Weg ermittelten Serumtestosteronkonzentrationen sind:

- a) Serum gesunder Männer: $6,6 \pm 2,2\text{ng/ml}$ (n=14)
- b) Serum einer Gesunden Frau: $0,16\text{ng/ml}$ (n=1)
- c) Serum von Frauen mit Hirsutismus:
 $0,7 \pm 0,2\text{ng/ml}$ (n=9)
- d) Serum hypogonader Männer: $1,1\text{ng/ml}$ (n=2)

Die Meßwerte bei Bestimmung der Serumtestosteronkonzentrationen im RIA vor und nach HPLC korrelieren mit $r = 0,97$ (n=26).

Ein Versuch, die niedrigen Serumkonzentrationen der Steroide doch UV-photometrisch nachweisbar und damit integrativ meßbar zu machen, ist letztendlich die Derivatisierung im Anschluß an die Extraktion.

Verwendet wird der Farbstoff 2.4.-Dinitrophenylhydrazin, der in nukleophiler Addition an die Keto-gruppen der Steroide bindet. Die Umsetzung der hierfür in Methanol gelösten Steroidhormone geschieht unter Säurekatalysation durch Zugabe von 3 Tropfen konzentrierter Salzsäure und 1 Tropfen 0,2%iger 2.4.-DNPH-Lösung pro ml Hormonlösung der Konzentration 10µg/ml. Das Reaktionsgemisch wird bei 50°C eine Stunde geschüttelt.

Das Absorptionsmaximum des Produktes liegt bei 254nm Wellenlänge und ermöglicht somit die Detektion mit dem von uns eingesetzten UV-Photometer.

Die Isolation des Derivates geschieht durch präparative Dünnschichtchromatographie mit Chloroform : Dioxan = 47 : 3 als Laufmittel. Die Trennung der fünf Hormon-derivate mit HPLC geschieht unter Verwendung von

Acetonitril : H₂O = 6 : 4 + 10% THF.

Die durch Derivatisierung erzielte, für unsere Zwecke ungenügende, Steigerung der Nachweisempfindlichkeit beläuft sich auf maximal den Faktor 2 und bleibt damit hinter den Erwartungen zurück. Der Grund dürfte in der nicht vollständig zu erzielenden Umsetzung liegen.

5. LITERATUR

1. ALLENMARK, S., A.BERG, e.a.
Combined paper and reversed-phase HPLC method
for the study of pregnenolone and progesterone
metabolites
J. Chromatogr. 224 (3) (1981) 399-504
2. AXELSON, M., B.-L.SAHLBERG and J.SJÖVALL
Analysis of profiles of conjugated steroids
in urine by ion-exchange separation and
gas chromatography-mass spectrometry
J. Chromatogr. 224 (1981) 355-370
3. BARFORD, R.A., B.J.SLIWINSKI, A.C.BREYER and
H.L.ROTHBART
Mechanism of protein retention in reversed-
phase high-performance liquid chromatography
J. Chromatogr. 235 (1982) 281-288
4. BASSETT, R.M.
A simple chromatographic method for the
radioimmunoassay of four androgenic steroids
Med. Lab. Sciences 37 (1980) 31-38
5. BAUERSFELD, W., D.RATGE, E.KNOLL und H.WISSER
Bestimmung der Catecholamine im Plasma mit
HPLC und amperometrischer Detektion
Fresenius' Z. Anal. Chem. 317 (6) (1984)
679-680
6. BAUMEISTER, M., G.K.STALLA and O.A.MÜLLER
Problems in quantitative analysis of five
steroid hormones by HPLC
Fresenius' Z. Anal. Chem. 317 (6) (1984)
683-684

7. BURMAN, K.D., R.BONGIOVANNI, R.K.GARIS,
L.WARTOFSKY and T.M.BOEHM
Measurement of Serum T_4 concentration by
high performance liquid chromatography
J. Clin. Endokrinol. Metab. Vol.53, No.5
(1981) 909-912
8. DANNENBERG, H.
Abh. preuß. Akad. Wiss. 21, 3 (1939)
9. DIXON, P.F., STOLL, LIM
HPLC in clinical chemistry. Review
Ann. Clin. Biochem. 13/4 (1976) 409-432
10. DUPPEL, W.
Flüssigkeitschromatographie: Der Einfluß
von Geleigenschaften und Laufmittelzusammen-
setzung auf die Auflösung
GIT Fachz. Lab. 22 Jg 7/1978
11. ENGELHARDT, H.
Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
2.Aufl. 1977, Springer-Verlag, Berlin-Heidel-
berg-New York
12. FIESER and FIESER
Reagents for organic synthesis
1967, J.Wiley and Sons, Inc., New York,
London, Sydney
13. FITZPATRICK, F.A.
High-performance liquid chromatography of
the steroid hormones
Chapter 2
14. GATTERMANN, L.
Die Praxis des organ. Chemikers
de Gruyter-Vlg., Berlin 1965
15. GROSS, R., P.SCHÖLMERICH
Lehrbuch der Inneren Medizin, 6.Auflage,
1982, Schattauer Verlag Stuttgart-New York

16. HANNAK, D., M.A.GÖTZE, R.KATTERMANN
Bestimmung der Gesamt-Östrogene im Serum
mit einem heterogenen Enzymimmunoassay
Fresenius'Z. Anal. Chem. 301 (1980) 131-132
17. HANSON, C., e.a.
J. Chromatogr. 162 (1) (1979) 7-22
18. HEFTMANN, E., J.R.HUNTER
High-pressure liquid chromatography of steroids
J. Chromatogr. 165 (1979) 283-299
19. HEFTMANN, E., J.-T.LIN
Steroid analysis by high-performance liquid
chromatography
J. Liquid Chromatogr. 5 (Suppl.1) (1982)
121-173
20. HORIKAWA, R., T.TANIMURA and Z.TAMURA
Method for fluorescence detection in the
high-performance liquid chromatography of
4-3-Ketosteroids
J. Chromatogr. 168 (1979) 526-529
21. HORN, K., J.HENNER, O.A.MÜLLER, P.C.SCRIBA
Mechanismisierte Hormon-Analytik mittels simul-
taner Säulenchromatographie
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 13.Jg.(1975) 173-178
22. HUNTER, J.R., M.K.WALDEN and E.HEFTMANN
High-pressure liquid chromatography of andro-
gens
J. Chromatogr. 176 (1979) 485-487
23. IMAI, K.
J. Chromatogr. 105 (1975) 135-140
24. KAGE, A., B.WEBER, CHR.MÜLLER and M.SCHÖNESHÖFER
Multidimensional liquid chromatography for
the quantitation of low concentration compounds
in body fluids
Fresenius'Z.Anal.Chem. 317 (6) (1984) 669-670

25. KAISER, R., A.PFLEIDERER
Lehrbuch der Gynäkologie, 14.Auflage, 1982,
Thieme Verlag Stuttgart-New York
26. KARLSON, P.
Kurzes Lehrbuch der Biochemie
10.Aufl.1977, Thieme Verlag, Stuttgart
27. KAWASAKI, T., M.MAEDA and A.TSUJI
Determination of 17-oxosteroids - in serum
and urine by fluorescence high-performance
liquid chromatography using dansyl-hydrazine
as a prelabeling reagent
J. Chromatogr. 226 (1981) 1-12
28. KAWASAKI, T., M.MAEDA and A.TSUJI
Determination of 17-Hydroxycorticosteroids
in urine by fluorescence high-performance
liquid chromatography using Dns-Hydrazine
as a pre-column labeling reagent
J. Chromatogr. 232 (1982) 1-11
29. KAWASAKI, T., M.MAEDA and A.TSUJI
Fluorescence high-performance liquid chromato-
graphy for determination of ketosteroids
in biological fluids using dansyl hydrazine
application to clinical analysis
Yakugaku Zasshi 100 (9) (1980) 925-932,
Japan
30. KAWELER, HWANG, KELSEY
Separation of epimeric monohydroxylated
metabolites of testosterone, androstenedione
and the p-nitrobenzyl-esters of hydroxylated
5B-cholanic acid using the same HPLC-conditions
Chromatographia 14 (11) (1981) 633-637

31. KESSLER, M.J.
A rapid high performance liquid chromatography
System for the separation of gonadal steroids
J.Liquid Chromatogr. 5 (1) (1982) 125-139
32. KESSLER, M.J.
A rapid method of quantitating steroids
resulting from the incubation of gonadal
tissues with radioactiv precursors
J. Liqu. Chromatogr. 5 (2) (1982) 315-325
33. KITA, T., K.ISHIMARU, S.SAITO
Quantitative determination of adrenal steroids
in serum and urine by HPLC
Rinsho Byori 29 (7) (1981) 662-669, Japan
34. KUTNER, DEBOWSKI, KEMULA
Polarographic detection for HPLC using a
flow-through-detector
J. Chromatogr. 191 (1) (1980) 47-60
35. LANDGRAF, W.C., E.C.JENNINGS
Steroid determination from complex mixtures
by HPLC-techniques
J. Pharm. Sci. 62 (2) (1973) 278-281
36. LATSCHA; H.P., H.A.KLEIN
Chemie für Mediziner
4.Auflage, 1977, Springer-Verlag, Berlin-
Heidelberg-New York
37. LAWRENCE, J.F. and R.W.FREI
Chemical derivatization in liquid chromatogra-
phy
J. Chromatogr. Library, Vol. 7 (1976) 124-126
Elsevier Scientific Publishing Company,
Amsterdam, New York

38. LEE, G.J.-L., R.M.K.CARLSON, S.KUSHINSKY
Use of organic modifiers in the mobile phase
for the reversed-phase HPLC-Separation of
steroidal hormones
J. Chromatogr. 212 (1) (1981) 108-114
39. LIN, J.-T., E.HEFTMANN
Comparison of adsorption and reversed-phase
partition high-performance liquid chromatogra-
phy for the separation of androgens
J. Chromatogr. 237 (1982) 215-224
40. LÖFFLER, PETRIDES, WEISS, HARPER
Physiologische Chemie
2.Aufl.1979, Springer-Verlag, Berlin-
Heidelberg-New York
41. MAJORS, HOPPER
Siloxane phases bonded to silica gel for
use in HPLC
J. Chromatogr. Sci. 12 (12) (1974) 767-778
42. MAYER, E., H.SCHMIDT-GAYL, K.LICHTWALD,
E.KRAAS und R.KNUPPEN
Simultane Bestimmung von 25-Hydroxy-Vitamin
D₂ und 25-Hydroxy-Vitamin D₃ durch Hochdruck-
flüssigkeitschromatographie
Ärztli.Lab. 27 (1981) 89-94
43. MICE, E.C. and M.J. O'HARE
Selective effects of reversed-phase column-
packings in high-performance liquid chromato-
graphy of steroids
J. Chromatogr. 166 (1978) 263-267
44. MORRISON, R.T., R.N.BOYD
Lehrbuch der organischen Chemie
Verlag Chemie, 1974, Weinheim

45. NEUDERT, W., H.RÖPKE
Steroid Spektrenatlas
1965, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-
New York
46. NEUMANN, G., H.PERLMUTTER
Optimierungsmöglichkeiten bei Gelfiltrationen
Informationen der LKB Instrument GmbH,
Gräfelfing
47. NEWTON, BRASELTON, e.a.
Rapid separation of testosterone and its
microsomal metabolites by reversed-phase
HPLC
J.Liqu.Chromatogr. 5 (3) (1982) 563-570
48. O'HARE, M.J., E.C.NICE, R.MAGEE-BROWN and
H.BULLMAN
High-Pressure Liquid Chromatography of Steroids
Secreted by Human Adrenal and Testes Cells
in monolayer culture
J. Chromatogr. 125 (1976) 357-367
49. O'HARE, M.J., E.NICE
Analysis of steroid hormones in adrenal
and testicular cells and tissues
Chromatogr. Sci. 16 (1981) 277-322
50. PHARMACIA FINE CHEMICALS LITERATURE SERVICE
Sephadex LH-20 chromatography in organic
solvents
Informationsbroschüre 8/1978 Uppsala Sweden
51. PHARMACIA FINE CHEMICALS LITERATURE SERVICE
Gel filtration theory and practice
Informationsbroschüre 1978 Uppsala Sweden

52. RAMIREZ, L.C., C.MILLOT and B.F.MAUME
Sample purification using a C₁₈-bonded reversed-phase cartridge for the quantitative analysis of corticosteroids in adrenal cell cultures by high-performance liquid chromatography or gas chromatography-mass spectrometry
J. Chromatogr. 229 (1982) 267-281
53. READMAN, J.W., L.BROWN, M.M.RHEAD
Use of stop-flow UV-scanning and variable-wavelength detection for enhanced peak identification and sensitivity in HPLC
Analyst 106 (1258) (1981) 122-126
54. RHOADS, D.G.
Urinary Steroid metabolite analysis: potential for renaissance
Clin.Chem., Vol.27, No.3 (1981) 509
55. SHACKLETON, C.H.L. and J.O.WHITHNEY
Use of Sep-pak^R cartridges for urinary steroid extraction: evaluation of the method for use prior to gas chromatographic analysis
Clin.Chim.Acta 107 (1980) 231-243
56. SHAIKH, HALLMARK, e.a.
Use of HPLC and TLC for the separation and detection of testosterone and its metabolites from in vitro incubation mixtures
J. Liqu. Chromatogr. 2 (7) (1979) 943-956
57. SIPPELL, W.G., F.BIDLINGMAIER, D.KNORR
Mechanized Sephadex LH-20 multiple column chromatography as a prerequisite for automated multi-steroid radioimmunoassays
IAEA-SM-220/10

58. SIPPELL, W.G., F.BIDLINGMAYER, H.BECKER, T.BRUNIG,
H.DÖRR, H.HAHN, W.GOLDER, G.HOLLMANN and
D.KNORR
Simultaneous radioimmunoassay of plasma
aldosterone, corticosterone, 11-deoxycortico-
sterone, progesterone, 17-hydroxyprogesterone,
11-deoxycortisol, cortisol und cortisone
J. Steroid Biochem. Vol.9 (1978) 63-74
59. SOKOLOWSKI, G., W.G.WOOD
Radioimmunoassay in Theorie und Praxis
Schnetztor-Verlag, Konstanz 1981
60. STALLA, G.K.
HPLC-Techniken und Möglichkeiten der Anwendung
Kolloquium endokrinolog. Methoden
Medizin.Klinik Innenstadt d.Univ.München
23.11.1982
61. STALLA, G.K.
Optimierung der radioimmunologischen Bestim-
mungsmethoden von Cortisol und Calcitonin
Dissertation, Universität München, 1980
62. SULEIMANN, S. and C.L.BLANKE
Anal.Chem.Acta 104 (1) (1979) 29-45
63. SCHETTLER, G.
Innere Medizin
5.Auflage,1980, Thieme-Verlag, Stuttgart-
New York
64. SCHÖNESHÖFER, M., H.J.JASTER and A.FENNER
HPLC - RIA: A convenient alternative for
the specific estimation of multiple steroid
hormones
Fresenius'Z.Anal.Chem. 301 (1980) 130-131

65. SCHÖNESHÖFER, M., H.J.DULCE
Comparison of different high performance liquid chromatographic systems for the purification of adrenal and gonadal steroids prior to immunoassay
J. Chromatogr. 164 (1979) 17-28
66. SCHWEDT, G., E.REH
Fluorometric reaction detectors for HPLC Part 1, Selection of chemical reactions
Chromatographia 14 (4) (1981) 249-253
67. SCHWEDT, G., E.REH, e.a.
Structure and optimization of a fluorometric reaction detector with an air-segmented fluid stream for HPLC, Part 1, Selection of chemical reactions using steroids as an example
Chromatographia 13 (12) (1980) 779-784
68. SCHWEDT, G., E.REH
Construction and optimization of fluorometric reaction detectors with air-segmented liquid streams for HPLC, Part 2, Reactor materials and effects of variable dynamic demensions
Chromatographia 14 (2) (1981) 123-126
69. SCHWEDT, G., e.a.
Z.Anal.Chem. 283 (1977) 23-28
70. TOOTHAKER, R.D., G.M.SUNDARESAN, e.a.
Oral hydrocortisone Pharmacokinetics:
A comparison of fluorescence and ultraviolet high-pressure liquid chromatographic assays for hydrocortisone in plasma
J. Pharmac.Sciences 71, No.5 (1982) 573

71. UIHLEIN, M., E.SCHWAB
A novel reactor for photochemical post-column derivatization in HPLC
Chromatographia 15 (2) (1982) 140-146
72. WALTERS, D.G., P.M.D.FOSTER, R.C.COTTRELL
High-performance liquid chromatography of progesterone and its metabolites
J. Chromatogr. 219 (1981) 152-155
73. WATERS ASSOCIATES: Operator's Manual for Data Module M 730, Milford, USA, Sept.1981
74. WEHNER, R. and A.HANDKE
An improved Extraction Method for plasma steroid hormones
Clin.Chim.Acta 93 (1979) 429-431
75. v.WERDER, K., R.GOEBEL, O.A.MÜLLER
Hirsutismus - Ursachen - Diagnostik - Therapie
Internist 20 (1979) 75-84
76. WERNER, W.
Einsatz der HPLC in der Umweltanalytik
GIT Fachz.Lab.22.Jg. 9/1978 785-788
77. WHITNEY, J.O., M.M.THALER
A simple liquid chromatographic method for quantitative extraction of hydrophobic compounds from aqueous solutions
J. Liq. Chromatogr. 3 (4) (1980) 545-556

LEBENS LAUF

Am 7.3.1960 wurde ich, Marina Baumeister, als erstes von drei Kindern des Kaufmanns Helmut Baumeister und seiner Gattin Gerlinde, geb. Haala, kaufmännische Angestellte, in Bad Wimpfen, Kreis Heilbronn, geboren.

Von 1966 bis 1968 besuchte ich die Grundschule in Mosbach/Baden, von 1968 bis 1969 die Grundschule in Surheim/Obb., Kreis Berchtesgadener Land.

Im Herbst 1969 trat ich in das neusprachliche Gymnasium in Laufen/Obb. ein, wo ich im Juni 1978 das Abitur ablegte.

Zum Wintersemester 1978/79 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Ludwig Maximilians-Universität in München.

Die ärztliche Vorprüfung bestand ich im August 1980, den I. Teil der ärztlichen Prüfung im August 1981, den II. Teil der ärztlichen Prüfung im März 1984.

Ab November 1982 arbeitete ich im Laboratorium für Endokrinologie bei Herrn Prof. Dr. med. O.A. Müller und Herrn Dr. G.K. Stalla in der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. E. Buchborn) an der vorliegenden Arbeit.

Mein Studium endete mit dem III. Teil der ärztlichen Prüfung im April 1985.

